

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERRIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المركز الجامعي عبد الحفيظ
بوالصوف ميلة



Centre Universitaire Abdel Hafid
Boussouf Mila

Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

En Biochimie Appliquée

Thème

**Effet préventif de la vitamine C contre le stress
oxydatif**

Filière : Sciences Biologiques

Présenté par :

Layoufi Chayma
Manseur Djihane

DEVANT LE JURY

Président :	L. Douafer	M.C. Centre Universitaire de Mila.
Encadreur :	L. Kadeche	M.C. Centre Universitaire de Mila.
Examineur :	M. Bendjeddou	M.C. Centre Universitaire de Mila.

Année universitaire : 2020/2021

Dédicace

*Avant toutes choses, je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donné
la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*A mes chers parents pour les encouragements, tendresse, l'affection et
le soutien durant mes études : vous étiez toujours là pour m'écoutez,
me sourire, me reconforter et m'encourager dans les moments de
doute*

*Je souhaite que vous trouverais ici le fruit de vos sacrifices.
Que ALLAH vous bénisse et vous accorde une longue vie pleine de sante
et de bonheur.*

A ma chère sœur Yasmine

A mes chers frères yahia, zakarya et yacine

A toute ma famille Manseur, Saada

A tous mes amis (es)

A tous mes professeurs.

DJIHANE

Dédicace

*Avant toutes choses, je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donné
la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude :
À mes très chers parents, que j'admire, qui m'ont toujours aidé dans ma vie et qui
n'ont cessé de m'encourager et de me soutenir tout au long
de mes études.*

*Vous m'avez appris la rigueur, la ténacité et surtout l'humilité. Puisse ce travail
témoigner de ma reconnaissance à cette éducation. Papa Maman, que ce travail
témoigne ma fierté de reprendre le flambeau.*

*Que ALLAH vous garde et vous
Protège.*

À mes chers frères Abd Razak, Radwan

À mes chères sœurs Sarah et Wedad

À toute ma famille layoufi

À ma chère amie Maryam

*À mes chères amies : sara, hind, chayma, samah, siham, sabrina, firouz, chahinaz
et mon binôme djihane*

À tous ceux qui m'aiment

À tous ceux que j'aime.

Chayma

REMERCIEMENT

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à Mademoiselle Kadeche Lilia. Maître de conférences à l'Université Abdelhafid Boussouf de Mila pour avoir accepté de diriger et de réaliser ce travail. Nous vous remercions pour votre confiance, votre soutien et votre disponibilité. Vos qualités morales, intellectuelles et surtout votre intérêt pour la science forcent le respect et l'admiration.

Nous exprimons également nos vifs remerciements à Mademoiselle Douafer Louiza. Maître de conférences à l'Université Abdelhafid Boussouf de Mila d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de notre mémoire. Votre simplicité et votre modestie sont à la dimension de votre envergure scientifique.

Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à Madame Bendjeddou Mona. Maître de conférences à l'Université Abdelhafid Boussouf de Mila pour avoir accepté de juger ce travail et nous honorer de sa présence.

Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance à ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉS

الملخص

الإجهاد التأكسدي، السبب الرئيسي للعديد من الأمراض ، يتوافق مع عدم التوازن بين الدفاعات المضادة للأكسدة الذاتية وإنتاج الجزيئات المؤيدة للأكسدة (أنواع الأكسجين التفاعلية على وجه الخصوص). تتولد هاته الأنواع التفاعلية للأكسجين بالتنفس الخلوي و كذلك أثناء التفاعلات المناعية وتحت تأثير المؤكسدات البيئية، مثل التدخين أو التلوث.

مضادات الأكسدة هي عوامل تتفاعل بسهولة مع أنواع الأكسجين التفاعلية لتثبيطها والقضاء عليها، أو تقليل إنتاجها. تستند مضادات الأكسدة إلى المدخول الغذائي (الفيتامينات، المعادن، البوليفينول، ...) التي توفر مضادات الأكسدة الخارجية وإنتاج العضوية لمضادات الأكسدة الداخلية (مثل الإنزيمات، البيليروبين، حمض اليوريك ، ...).

يتطلب فهم الإجهاد التأكسدي معرفة جيدة لتفاعلية أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة وآليات عمل أنظمة مضادات الأكسدة.

في هذا العمل، سنقوم بتفصيل أنظمة الأكسدة ومضادات الأكسدة الخلوية وتقديم مثال على مضادات الأكسدة الطبيعية (الفيتامين س). سنناقش أيضًا الدراسات التي تبرز دور هذا الفيتامين المضاد للأكسدة كوسيلة لمكافحة الإجهاد التأكسدي.

الكلمات المفتاحية: الجذور الحرة، أنواع الأكسجين التفاعلية، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، مضادات الأكسدة الطبيعية، الفيتامينات المضادة للأكسدة، فيتامين س.

ABSTRACT

Oxidative stress, the main initial cause of several diseases, corresponds to an imbalance between endogenous antioxidant defenses and the production of pro-oxidant molecules (reactive oxygen species, in particular). These reactive oxygen species produced by cellular respiration, are also generated during immune reactions and under the effect of environmental oxidants, such as tobacco or pollution.

Antioxidants are agents that react readily with reactive oxygen species to inactivate and eliminate them, or decrease their production. They are based on dietary intake (vitamins, minerals, polyphenols,...) that provide exogenous antioxidants and the body's production of endogenous antioxidants (enzymes, bilirubin, uric acid,...).

The understanding of oxidative stress requires a good knowledge of the reactivity of the various reactive oxygen species (ROS) and the mechanisms of action of the antioxidant systems.

In this work, we will detail the cellular oxidant and antioxidant systems and will present an example of natural antioxidant (vitamin C). We will also discuss studies that seem to highlight this vitamin as a way to combat oxidative stress.

Key words: Free radicals, Reactive oxygen species, Oxidative stress, Antioxidants, Natural antioxidants, Antioxidant vitamins, Vitamin C.

RÉSUMÉ

Le stress oxydant, la principale cause initiale de plusieurs maladies, correspond à un déséquilibre entre les défenses antioxydantes endogènes et la production de molécules pro-oxydantes (espèces réactives de l'oxygène, notamment). Ces espèces réactives de l'oxygène produites par la respiration cellulaire, sont également générées lors des réactions immunitaires et sous l'effet d'oxydants environnementaux, comme le tabac ou la pollution.

Les antioxydants sont des agents qui réagissent facilement avec les espèces réactives de l'oxygène pour les inactiver et les éliminer, ou diminuer leur production. Ils sont fonction des apports alimentaires (vitamines, sels minéraux, polyphénols,...) qui fournissent des antioxydants exogènes et de la production par l'organisme d'antioxydants endogène (enzymes, bilirubine, acide urique,...).

La compréhension du stress oxydant passe par une bonne connaissance de la réactivité des diverses espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des mécanismes d'action des systèmes antioxydants.

Dans ce travail, nous détaillerons les systèmes oxydants et antioxydants cellulaires et présenterons un exemple d'antioxydant naturel (la vitamine C). Nous discuterons aussi des études qui semblent mettre en évidence cette vitamine comme un moyen pour lutter contre le stress oxydant.

Mots clé : Radicaux libres, Espèces réactives de l'oxygène, Stress oxydant, Antioxydants, Antioxydants naturels, Vitamines antioxydantes, Vitamine C.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABRÉVIATIONS

Enzymes/ions/substances :

AA	: Acide ascorbique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AGE	: Produit de glycation
AGPI	: Acide gras polyinsaturés
ATP	: Adénosine Tri-Phosphate
BSA	: Albumine sérique bovine
CAT	: Catalase
Coq10	: Coenzyme Q10
CAT	: Catalase
Cu	: Cuivre
CYP450	: Cytochrome P450
Cyt C	: Cytochrome C
DHA	: Acide déhydroascorbique
DO	: Densité optique
DTNB	: Dithio-bis2-nitrobenzoïque
DO	: Densité optique
DTNB	: Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman
ERO	: Espèces réactives oxygénées
FADH2	: Flavine adénosine dinucléotide
Fd	: Facteur de dilution
Fe²⁺	: Ion ferreux
Fe³⁺	: Ion ferrique
Gpx	: Glutathion peroxydase

LISTE DES ABRÉVIATIONS

GR	:	Glutathion réductase
GSH	:	Glutathion réduit
GSHPX	:	Glutathion peroxydase
GSSG	:	Glutathion oxydé
GST	:	Glutathion-S-transférase
H₂O	:	Eau
H₂O₂	:	Peroxyde d'hydrogène
HClO	:	Acide hypchloreux
HMG COA	:	3-hydroxy-3-methylglutaryl-2-nonéna
HO°	:	Radical hydroxyl
HO₂°	:	Hydroperoxyde
HTA	:	Hypertension artériel
IC	:	Insuffisance cardiaque
IRA	:	Insuffisance rénale aigue
L	:	Largeur de la cuve ou longueur du traget optique
LDL	:	Lipoprotéine de base densité
LPO	:	La peroxydation lipidique
MDA	:	Malondialdehyde
Mn	:	Manganèse
Mn-SOD	:	Superoxyde dismutase associée au manganèse
NAD⁺	:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduite
Ni	:	Nickel
NO°	:	Monoxyde d'azote
NO₂°	:	Dioxyde d'azote
O₂	:	Oxygène ou Dioxygène
O₂°	:	Anion superoxyde

LISTE DES ABRÉVIATIONS

O₃	:	Ozone
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
ONOO⁻	:	Peroxynitrite
ONOOH	:	Nitroperoxyde
Ph	:	Protéine kinase C
Prx	:	Peroxirédoxine
RL	:	Radical libre
RLO	:	Radicaux libre oxygénés
RO[•]	:	Alkoxyde
RO₂[•]	:	Peroxyde
ROO[•]	:	Radicaux peroxyde
ROS	:	Reactive Oxygen Species
Se	:	Sélénium
Se-GPx	:	Glutathion peroxydase sélénio dépendante
SO	:	Stress oxydant ou stress oxydatif
SOD	:	Superoxyde dismutase
SVCT	:	Sodium-Dependent Vitamin C Transporters
TBA	:	Thiobarbiturique
UQ	:	Ubiquinone
UV	:	Ultra-Violet
VTC	:	Vitamine C
VTE	:	Vitamine E
XD	:	Xanthine déshydrogénase
XO	:	Xanthine oxydase
XOR	:	Xanthine oxydoréductase
Zn	:	Zinc
α-TOH	:	α-tocophérol

Unités

%	:	Pourcentage
°C	:	Degré Celsius
Cm	:	Centimètre
h	:	Heure
g	:	Gramme
L	:	Litre
M	:	Molaire
mg	:	Milligramme
Min	:	Minute
ml	:	Millilitre
mM	:	Millimole
Mol	:	Mole
nm	:	Nanomètre
nmol	:	Nanomole
µl	:	Microlitre
µM	:	Micromolaire

TABLES DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

FIGURE	TITRE	PAGE
Figure 1	La formation d'un radical libre	03
Figure 2	Voie métabolique de l'oxygène et des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	07
Figure 3	Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	09
Figure 4	Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons	10
Figure 5	Effets potentiels du stress oxydant sur les composants cellulaires et sur l'organisme	16
Figure 6	Réactions de la peroxydation lipidique en chaîne	17
Figure 7	Nature de quelques modifications des chaînes d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	18
Figure 8	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	19
Figure 9	La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle	20
Figure 10	Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase	22
Figure 11	Structure tridimensionnelle de la catalase	23
Figure 12	Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase	24
Figure 13	Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase	25
Figure 14	État d'oxydation du glutathion	26
Figure 15	Structure chimique des ubiquinones	27
Figure 16	Structure chimiques des vitamines E	29
Figure 17	Régénération de la vitamine E	30
Figure 18	Structure chimique de la vitamine C	31
Figure 19	Structure du noyau phénol	32
Figure 20	Voie des polyols et stress oxydant	35
Figure 21	Structure de la paroi artérielle	36
Figure 22	Structure chimique de l'acide ascorbique	40
Figure 23	Forme réduite, forme radicalaire et forme oxydée de la vitamine C	41
Figure 24	Forme oxydée et oxydante, forme réduite et réductrice de la vitamine C	42
Figure 25	Principe de dosage du glutathion	49
Figure 26	la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines	51
Figure 27	Principe de dosage du malondialdéhyde	51

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	TITRE	PAGE
Tableau 1	Principales ERO radicalaires et non-radicalaires	05
Tableau 2	Les différentes propriétés physico-chimiques de la vitamine C	41
Tableau 3	Les 20 meilleures sources naturelles de la vitamine C	43

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

CHAPITRE I. Stress oxydant :

I. Stress oxydant

1. Radicaux libres	3
1.1. Généralité sur les radicaux libres.....	3
1.2. Les radicaux libres biologiques	4
2. Définition du stress oxydant.....	5
3. Mécanismes de production des principales ERO	6
3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	6
3.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2	7
3.3. Le radical hydroxyle HO^{\cdot}	8
3.4. L'oxygène singulet 1O_2	9
4. Sources des ERO ou ROS	9
4.1. Sources endogènes.....	10
4.2. Sources exogènes.....	13
5. Cibles biologiques des ROS	16
5.1. Peroxydation lipidique	16
5.2. Oxydation des protéines.....	18
5.3. Oxydation de l'ADN.....	19
6. Antioxydants.....	21
6.1. Définition	21
6.2. Mode d'action des antioxydants	21
6.3. Les systèmes de défense antioxydants	22
6.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	22
6.3.2. Les systèmes antioxydants non-enzymatiques	25
6.3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogènes.....	25
6.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes.....	29
7. Stress oxydant et pathologies humaines.....	33
7.1. Exemples des maladies liées au SO.....	34
7.1.1. Diabète	34
7.1.2. Athérosclérose	35

7.1.3. Insuffisance cardiaque (IC).....	37
7.1.4. Insuffisance rénale aigue (IRA).....	37

CHAPITRE II. Vitamine C :

II. Vitamine C

1. Généralités et rôles des vitamines.....	39
1.1. L'acide ascorbique (Vitamine C).....	39
1.1.1. Structure.....	40
1.1.2. Caractéristiques physico-chimique.....	40
1.1.3. Propriétés oxydo-réductrices et stabilité	41
1.1.4. Sources alimentaires.....	42
1.1.5. Métabolisme	44
1.1.6. Rôles biologiques	44
1.1.6.1. Rôle antioxydant.....	45
1.1.6.2. L'acide ascorbique : une action pro-oxydante ?.....	46
1.1.7. Carence en vitamine C.....	46
1.1.8. Toxicité de la vitamine C.....	47

CHAPITRE III : Méthodes de dosage des biomarqueurs et Discussion d'études

I. Méthodes de dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

1. Le choix des biomarqueurs du stress oxydant	48
2. Méthodes de dosage des principaux biomarqueurs du stress oxydatif	49
2.1. Dosage du glutathion réduit (GSH)	49
2.1.1. Dosage des protéines	50
2.2. Dosage de malondialdéhyde (MDA)	51
2.3. Dosage de l'activité de la GPx	52
2.4. Dosage de la catalase (CAT)	53
2.4.1. Mode opératoire.....	54
2.4.2. Calcul de l'activité de CAT :.....	54

II. Discussion 55

Conclusion générale et perspectives..... 59

Références Bibliographiques..... 60

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

Introduction

L'oxygène est un élément indispensable à notre survie et notre développement, son rôle ne se résume pas à la respiration pulmonaire. Il constitue le centre même du métabolisme énergétique des cellules en participant à la production d'adénosine triphosphate (ATP) mitochondriale à partir des nutriments (glucides, lipides et protéines), par le biais de la phosphorylation oxydative couplée à la chaîne respiratoire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, et réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme donnant naissance à des espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Delattre et al., 2005).

La production de ces (EROs) est normale et s'accompagne d'un rôle physiologique important. Du fait de leur haute réactivité, elles jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription (Haleng et al., 2007). Cependant, cette production peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physiopathologiques (inflammation, réactions enzymatiques,...) ou facteurs environnementaux (tabac, alcool, pollution atmosphérique, rayonnement UV,...), provoquant ainsi des dégâts cellulaires (Favier, 2006).

De par leur nature instable, les (EROs) sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Pincemail et al., 2000). De ce fait, un maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO est assuré par des systèmes dits antioxydants, développés par l'organisme (Dröge, 2002).

Ces systèmes comprennent des enzymes qui catalysent la réduction d'EROs (e.g. catalase, superoxydes dismutases ou glutathion peroxidases), et des molécules non enzymatiques qui les neutralisent (e.g. glutathion réduit, acide ascorbique, vitamine E et polyphénols) (Regoli et Giuliani, 2014). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces

systèmes antioxydants engendre une augmentation des dommages tissulaires, c'est le stress oxydant (Dröge, 2002).

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est donc un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées. Le stress oxydant ainsi généré a été au cours des dernières années de plus en plus impliqué dans des pathologies diverses telles que les cancers, l'hypertension et le diabète de type 2. La plupart de ces pathologies apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale d'ERO (Favier, 2003).

Pour prévenir ce type de situations, la recherche sur la supplémentation en antioxydants a été le sujet de plusieurs études (Shati, 2014 ; Mehrpak et al., 2015 ; Ibrahim Elsayed et al., 2015), qui ont montré qu'un apport exogène en antioxydants peut réduire les dommages induits par le stress oxydatif. Ces antioxydants sont apportés chez l'homme à travers la consommation de fruits et légumes ou d'autres boissons à base de plante et peuvent s'avérer utiles pour la santé humaine (Shebis et al., 2013).

A ce titre, la vitamine C, particulièrement abondants dans une alimentation riche en fruits et légumes, pourrait jouer un rôle protecteur important qui a été attribué, en partie, à son potentiel antioxydant. L'acide ascorbique ou vitamine C permet, en effet, la dégradation des radicaux libres et est capable de piéger les EROs, tels que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN) (Frei et al., 1998).

À partir de ces connaissances, nous nous sommes intéressés dans ce mémoire de faire une recherche bibliographique sur le phénomène du stress oxydatif, d'une part, et de discuter les résultats de recherches précédentes, qui ont été menées dans le but de comprendre et de lutter contre ce phénomène, d'autre part.

Cette recherche est subdivisée en deux parties essentielles, initiés par une synthèse bibliographique dans laquelle nous apportons un premier chapitre qui traite les effets du stress oxydatif sur les macromolécules cellulaires et ainsi que le mécanisme de défense contre ce phénomène, un second chapitre qui synthétise les connaissances sur la vitamine C et ses propriétés biologiques. Dans la deuxième partie, nous avons exposé les principales méthodes utilisées pour le dosage des marqueurs du stress oxydant suivi d'une discussion des résultats issus de l'étude portant sur le stress oxydatif et l'action protectrice de la vitamine C. Enfin, les perspectives envisagées dans la continuité de cette recherche sont également présentées.

CHAPITRE I.
STRESS OXYDANT

I. Stress oxydant

1. Radicaux libres

1.1. Généralité sur les radicaux libres

Un radical libre (fig.1) est un atome ou une molécule qui porte sur sa couche électronique périphérique un ou plusieurs électrons non appariés, c'est-à-dire non couplés à un électron de spin opposé (Leverve., 2009 ; Rochette., 2008). Cette propriété lui confère une grande instabilité et par là même une extrême réactivité chimique (Halliwell et Gutteridge., 1990). De ce fait, les radicaux libres doivent donner un électron non apparié ou arracher un électron à une molécule avoisinante, afin de tendre vers un état moins excité, donc plus stable (Fang et al., 2002).

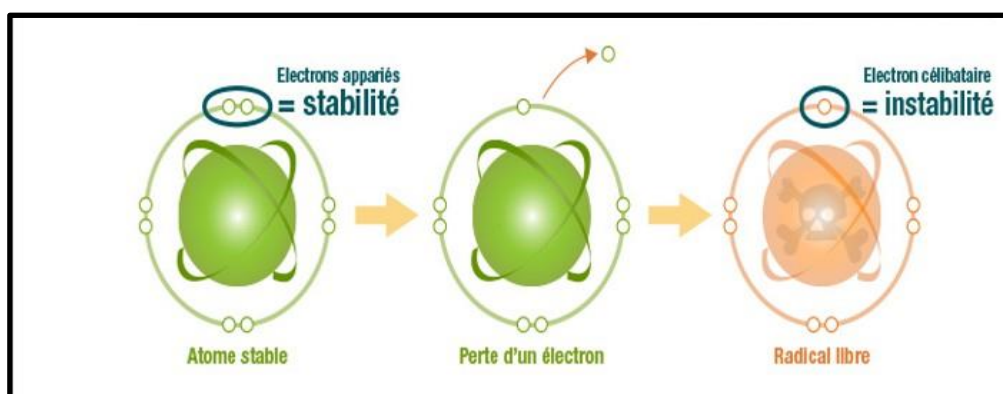


Figure 1 : La formation d'un radical libre

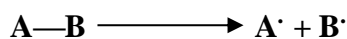
En fait, un radical libre peut être formé par oxydation, qui désigne la perte d'un ou plusieurs électrons (Halliwell et Gutteridge., 2008). Par exemple :



Un radical libre peut aussi être formé par gain d'un ou de plusieurs électrons, réaction appelée réduction (Halliwell et Gutteridge., 2008). Par exemple :



Ainsi, un radical libre peut être formé par fission homolytique, qui désigne la rupture d'une liaison chimique covalente où les deux électrons de la liaison A—B sont répartis équitablement (Halliwell et Gutteridge., 2008). Il en résulte deux radicaux libres contenant évidemment chacun un électron non apparié sur leur couche externe. Par exemple :



Les réactions de transfert d'électrons qui produisent les radicaux libres (réactions d'oxydoréduction, redox) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, car la molécule agressée par le radical libre devient à son tour radicalaire (Goto et al., 2008). Ce phénomène pouvant donc se propager par des réactions en chaîne (Carriere et al., 2006).

La durée de vie des radicaux libres est extrêmement très courte de la nano à la milliseconde, et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (R^\bullet) (Goto et al., 2008).

1.2. Les radicaux libres biologiques

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' O_2 (Droge., 2002). Les radicaux dérivés d'oxygène représentent, en effet, la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans les systèmes vivants à cause de l'importance de leur métabolisme aérobie (Valko et al., 2007). Cependant, d'autres espèces radicalaires sont encore à considérer, à savoir les espèces réactives de l'azote (Palmer et al., 1988).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer (Favier., 2003) :

Des radicaux primaires : dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, et le radical hydroxyle OH^\bullet ; ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^\bullet ;

Des radicaux secondaires : se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule ;

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites :

Espèces actives de l'oxygène : comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO), ou de l'anglais reactive oxygen species (ROS). Le tableau 1 reprend la nomenclature des espèces réactives, incluant les principales espèces réactives de l'oxygène (radicalaires et non radicalaires), seront reprises par la suite que celles qui sont les plus représentatives lors de l'étude du stress oxydant et susceptibles d'être évoquées à de nombreuses reprises.

Tableau 1 : Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Favier., 2003)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non radicalaire
- Anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Hydroxyle (OH^{\bullet})	- Acide hypochlorique ($HOCl$)
- Hydroperoxyde (HO_2^{\bullet})	- Ozone (O_3)
- Peroxyle (RO_2^{\bullet})	- Oxygène singulet (1O_2)
- Alkoxyde (RO^{\bullet})	- Hydroperoxyde ($ROOH$)
- Dioxyde de carbone ($CO_2^{\bullet -}$)	- Peroxynitrite ($ONOO^-$)

Toutes ces espèces oxygénées sont produites par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. En effet, elles participent (Favier., 2003) :

- ✓ au cycle cellulaire et au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire ;
- ✓ au fonctionnement de certaines enzymes ;
- ✓ à la transduction de signaux cellulaires ;
- ✓ à l'apoptose des cellules tumorales ;
- ✓ à la régulation des gènes ;...

Cette production physiologique des ERO est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents (Favier., 2003). Cependant, les ERO provoquent des dommages cellulaires si elles sont produites d'une manière incontrôlée (Kim et al., 2009).

En fait, l'hyperréactivité d'ERO les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN (Curtay et Robin., 2000). De ce fait, ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes dits antioxydants (Sies., 1991).

2. Définition du stress oxydant

Le stress oxydant est un terme général qui a été d'abord employé dans un contexte biologique par l'endocrinologue Hans Selye en 1936, pour décrire la réponse physiologique inadéquate d'un organisme (Schiafone et al., 2013). La définition de ce type de stress se réfère à

une rupture de l'équilibre homéostatique normalement maintenu entre la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et la défense antioxydante de l'organisme (Anderson., 1997).

Comme cité précédemment, il existe un équilibre entre d'une part les espèces réactives d'oxygène (ERO) qui sont présentes à l'état basal en faible concentration et d'autre part le système antioxydant. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/antioxydants est en équilibre. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés pro-oxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle alors de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier., 2003).

Le stress oxydant est donc une perturbation dans l'équilibre pro-oxydant/antioxydant en faveur de la formation des espèces réactives, conduisant à des dommages potentiels sur les cellules, les tissus et l'ADN (Anderson., 1997).

En médecine la balance oxydative est un concept pour maintenir l'organisme en bonne santé (Davies., 2000 ; Finkel and Holbrook., 2000). Son déséquilibre est sujet de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Heim et al., 2002 ; Noguchi., 2002). C'est pourquoi la recherche fondamentale du stress oxydant s'efforce à déchiffrer les bases moléculaires des agressions oxydatives provoquées par les ROS, ainsi que les systèmes physiologiques de protection et de réparation des lésions d'origine oxydatives (Enoiu., 2001). Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs de molécules très actives (Noguchi., 2002).

3. Mécanismes de production des principales ERO

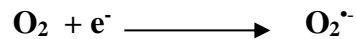
Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales (fig.2) : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'oxygène singlet (1O_2) :

3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Le radical superoxyde c'est le principal précurseur de la plupart des ROS, résulte de la réduction monovalente de l'oxygène, soit l'apport d'un électron à la molécule (O_2). Sa principale source dans une cellule est le complexe I et le complexe III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Piechota-Polanczyk et al., 2014 ; Rochette., 2008).

En fait, l'oxygène (O_2) est un élément essentiel pour des processus de la vie en aérobiose. Cependant, environ 5 % ou plus de l' O_2 inhalé est converti en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Merksamer et al., 2013).

En présence d'une quantité d'énergie suffisante, la molécule d'oxygène peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde (Bisbal et al., 2010) :



Un autre site de production de l'anion superoxyde est le polynucléaire neutrophile. Celui-ci utilise les ERO pour son activité phagocytaire. De plus, des enzymes comme la NADPH-oxydase et la xanthine-oxydase peuvent produire des radicaux superoxydes (Rochette., 2008).

L'anion superoxyde a une durée de vie relativement courte et est converti assez rapidement en différents produits, entre autres le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle qui est un des radicaux les plus réactifs que l'on retrouve dans les cellules vivantes et est capable de réagir avec n'importe quelle molécule particulièrement les lipides (McCord et Fridovich, 1969). D'ailleurs, cet effet de l'anion superoxyde contribue de façon majeure au développement de la dysfonction endothéliale (Gryglewski., 1986).

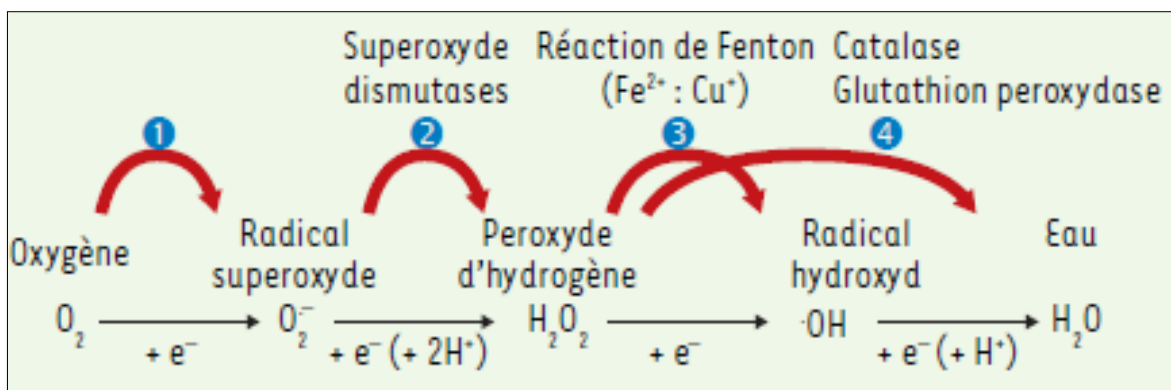


Figure 2 : Voie métabolique de l'oxygène et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Camille et Mireille., 2011)

3.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical, mais est un puissant agent oxydant ou réducteur et est produit à partir de la dégradation de l'anion superoxyde (Krieger-Brauer, Kather., 1992) :



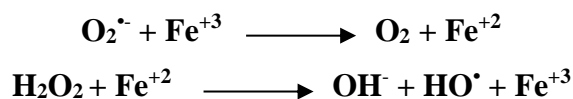
L'absence de charge à sa surface rend cette ERO très lipophile et peu réactif en milieu aqueux (Cash et al., 2007). Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est donc capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (Halliwell et Gutteridge., 1996).

En effet, en faible concentration, le peroxyde d'hydrogène ne présente pas de toxicité pour la cellule. Sa capacité à traverser les membranes biologiques et à diffuser loin de son lieu de synthèse, fait du H₂O₂ une des composantes utilisée par les cellules dans la signalisation intra et/ou intercellulaire. Cependant, en forte concentration, il induit une cytotoxicité par le biais des ERO qu'il génère (Favier., 2003).

3.3. Le radical hydroxyle HO•

Les radicaux hydroxyles sont définis comme la forme neutre de l'ion hydroxyde possédant une réactivité très élevée qui en fait un radical très délétère. Il s'agit du radical le plus toxique et il n'a pas de rôle physiologique connu. Ils réagissent ainsi de manière agressive avec des molécules organiques et inorganiques et peuvent causer des dommages plus graves à la cellule que tout autre RL.

Le radical hydroxyle OH• est créé dans la réaction de Fenton en tant que résultat d'interactions entre le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et des ions métalliques (Fe²⁺ ou Cu⁺) souvent liés sous des formes complexes avec différentes protéines telles que la ferritine ou la céruléoplasmine. Dans des conditions de stress, un excès d'O₂^{•-} peut libérer ces ions métalliques à partir de leurs complexes respectifs :



Le radical hydroxyle, est généré également par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss), engendrant alors un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO• (Comhair et Erzurum., 2002) :



Les radicaux hydroxyles sont particulièrement dangereux en raison de leur capacité à réduire les liaisons disulfures dans les protéines, en particulier le fibrinogène, ce qui entraîne leur dépliage et leur repliement brouillé en configurations spatiales anormales. Les conséquences de telles réactions peuvent se traduire par de nombreux troubles, tels que l'athérosclérose, le cancer et les pathologies neurologiques (Favier., 1997; Alkadi., 2018; Preedy., 2020).

Le radical hydroxyle apparaît donc comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge., 1993) et serait à l'origine de la

production des radicaux libres « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires (Boubekri., 2014).

3.4. L'oxygène singulet 1O_2

L'oxygène singulet (1O_2), une autre espèce réactive de l'oxygène, est principalement produite dans le vivant suite à une exposition à des rayons lumineux (Freinbichler et al., 2011), où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il est également formé in vivo par l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et par certaines d'autres réactions enzymatiques catalysées par des enzymes, telles que les lipoxygénases, les dioxygénases et la lactoperoxydase (Phaniendra et al., 2015).

L'oxygène singulet est très réactif et peut par exemple s'ajouter rapidement sur des doubles liaisons carbone-carbone (Yoshikawa et al., 2000). Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Halliwell., 2006).

Toutefois, il existe d'autres ERO tel que le monoxyde d'azote (NO^*), qui a un rôle dans de multiples fonctions physiologiques (De Backer, 2006). Mais, à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec O_2^* pour former un puissant oxydant le peroxydrite ($ONOO^*$), qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme *NO_2 et le OH^* (Densiov et Afanas'ev., 2005).

4. Sources des ERO ou ROS

Selon certains auteurs (Dalton et al., 2002 ; Fulbert et Cals., 1992 ; Yoshikawa et al., 2000 ; Tillement., 2001), les radicaux libres peuvent avoir plusieurs origines (fig.3). Ils sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être, produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire.

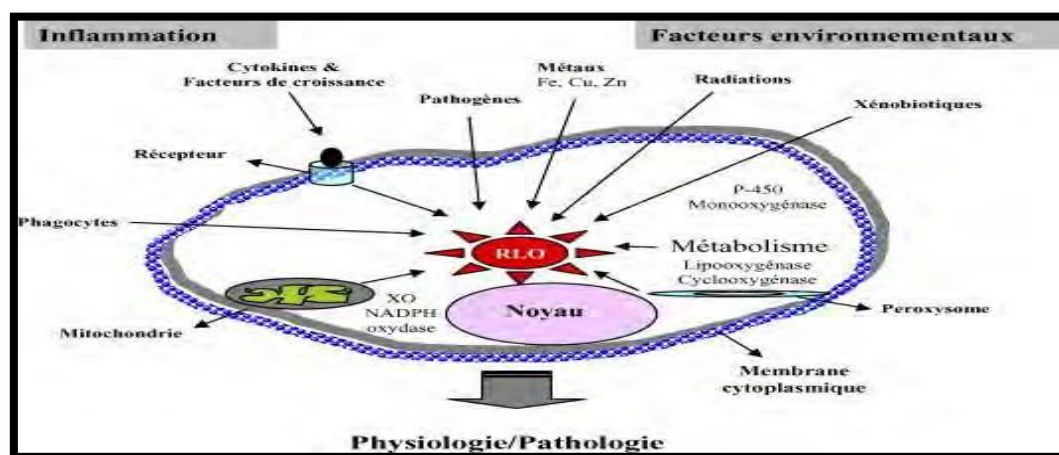


Figure 3 : Origine extracellulaire et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et al., 2007).

Il existe de nombreuses sources de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène. Elles sont classées en deux catégories, les sources endogènes, et les sources exogènes :

4.1. Sources endogènes

- *Mitochondrie*

La mitochondrie est considérée comme une des principales sources de ROS dans la cellule par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire (fig.4). Elle produirait, en effet, 90% des ROS cellulaires (Balaban et al., 2005). Cette production centralisée de ROS est due au fait que la mitochondrie est le lieu central de consommation de l'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative (Qutub et Popel., 2008).

La mitochondrie est un organe au cœur du métabolisme énergétique de la cellule. Elle est la machine de synthèse de l'ATP en condition aérobie. Si cette production constitue son rôle le plus connu, la mitochondrie est aussi impliquée dans d'autres mécanismes comme l'homéostasie calcique, l'apoptose et bien sûr la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Alcaraz et al., 2013).

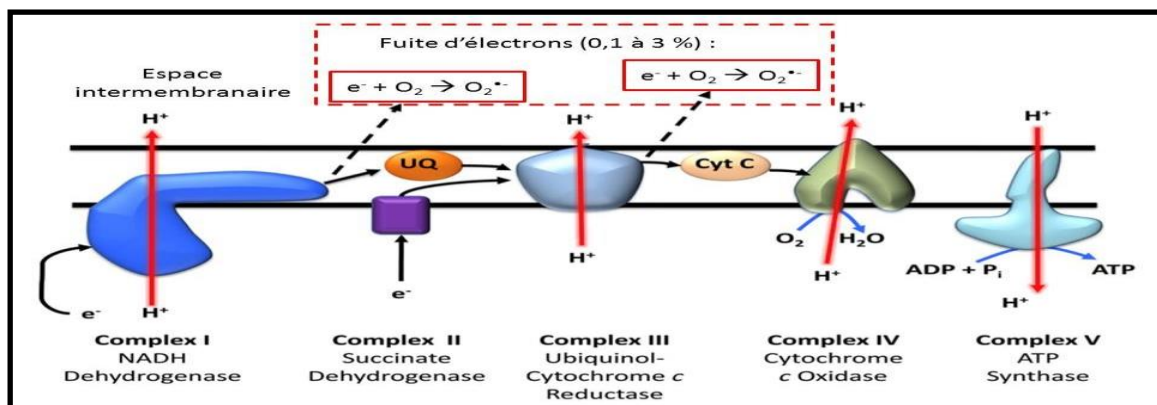


Figure 4 : Fuite d'électrons source de ROS au sein de la chaîne de transport d'électrons
D'après (Ghouleh et al., 2011)

(UQ : Ubiquinone ; Cyt C : Cytochrome C)

Au cours de la respiration mitochondriale, le NADH et le FADH₂ qui sont à l'origine de la synthèse d'ATP, cèdent respectivement leurs électrons aux complexes I et II de la chaîne respiratoire. Les électrons sont ensuite transférés aux complexes III et IV par le biais des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Ce processus crée un gradient de protons qui permet à l'ATP synthase de convertir l'ADP en ATP. Toutefois, des électrons peuvent être relâchés des complexes I et III, en réagissant avec l'oxygène, ces électrons libérés sont

responsables de la formation d'anion superoxyde (Nohl et al., 2005), qui est le précurseur d'autres formes de ROS comme le peroxyde d'hydrogène (Wu et al., 2011).

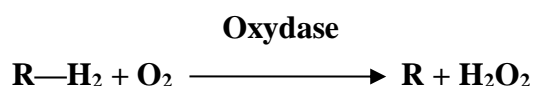
Le complexe III a longtemps été considéré comme le site principal de production d'O₂^{•-} (Turrens et Boveris., 1980). Néanmoins, ces dernières années, il a été largement montré que le complexe I joue aussi un rôle important dans la production d'O₂^{•-}, notamment dans les cellules cérébrales (Barja., 1999) en condition physiologiques et pathologiques, comme lors du vieillissement ou de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Schapira., 1998).

- ***Peroxisomes***

Les peroxysomes sont des organites retrouvés dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme à l'exception des hématies. Ils sont les seuls organites cellulaires avec les mitochondries et les réticulumms endoplasmiques à consommer de l'oxygène lors du métabolisme (Delattre et al., 2005). Ils sont, en fait, le siège d'une forte activité métabolique très centrée sur le métabolisme oxydatif (Corpas et al., 2001 ; Nyathi and Baker., 2006).

Ainsi, les peroxysomes sont constitués d'une membrane cytosolique phospholipidique simple et d'un contenu de composition très différente de celle du cytosol, dont de nombreuses oxydases (glycolate oxydase, urate-oxydase, acyl-CoA,...) et des antioxydants enzymatiques comme la catalase (Halliwell et Gutteridge., 2008). En raison de ces caractéristiques, les peroxysomes ont longtemps été considérés comme des organites spécialisés dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

En fait, les oxydases sont des enzymes utilisant le dioxygène O₂ comme accepteur d'électrons pour leur catalyse. Les enzymes oxydases enlèvent des atomes d'hydrogène libres à des substrats organiques spécifiques potentiellement dangereux pour la cellule. La déshydrogénation de ces molécules produit également du peroxyde d'hydrogène (Halliwell et Gutteridge., 2008) :



Toutefois, l'H₂O₂ généré est rapidement détoxifié par la catalase peroxysomale. Cette utilisation par la catalase joue un rôle particulier dans l'homéostasie (Hwang et al., 2012).

- ***Réticulum endoplasmique***

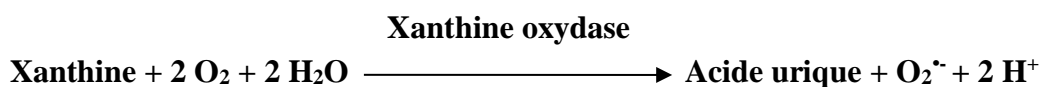
Le réticulum endoplasmique est un sous compartiment de la cellule. Il est séparé en réticulum endoplasmique rugueux et lisse. Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions de détoxification des drogues liposolubles et d'autres métabolites toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques tout en produisant des ERO.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des complexes enzymatiques qui utilisent le dioxygène pour oxyder un substrat (Halliwell et Gutteridge., 1986 ; Halliwell et Gutteridge., 1988). Il existe chez l'homme de multiples isoformes des CYP450 qui sont chacun spécifique d'un ou plusieurs substrats. La réaction catalysée par le CYP450 peut parfois conduire à la formation d'O₂⁻ lorsque l'O₂ subit une réduction monovalente (Rapoport et al., 1995).

- ***Xanthine oxydase***

Il existe deux types de xanthine oxydase inter-convertibles également connus sous le nom de xanthine oxydoréductase (XOR) qui diffèrent par leur forme et par leur mode d'action. Elles peuvent être soit de type xanthine oxydase (XO), dépendantes de l'O₂, soit de type xanthine déshydrogénase (XD), dépendantes du NAD⁺ (Favier., 2003).

La xanthine oxydase est une enzyme cytosolique qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine ainsi que la xanthine en acide urique (Harrison., 2002). Au cours de cette oxydation, elle utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons tout en produisant l'O₂⁻ (O'Mahony et al., 2013) :



La xanthine oxydase est surtout présente dans le foie mais peut se retrouver dans la circulation en cas d'atteinte hépatique. La production de ROS par la xanthine oxydase est faible en condition physiologique mais jouerait un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion. Dans le cas de l'ischémie, la grande consommation de l'ATP conduit à une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine et donc une production de ROS plus importante.

L'activité de la xanthine oxydase a aussi été détectée dans le cytosol des cellules endothéliales bovines (Jarasch et al., 1981), sur la surface cellulaire de cellules endothéliales

humaines (Rouquette et al., 1998), dans le plasma circulant (Tan et al., 1995) et dans les cardiomyocytes (Abadeh et al., 1992).

- *NADPH oxydase*

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (ou NADPH-oxydase) est un complexe enzymatique présent dans les membranes plasmiques des neutrophiles et des macrophages mais est aussi retrouvée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Jairam et al., 2012).

Les NADPH oxydases catalysent la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O_2), ce qui produit du $NADP^+$, du H^+ et de $l'O_2^{\cdot-}$. Ces deux derniers composés réagissent entre eux pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce complexe enzymatique entraîne ainsi la synthèse de ROS.

Les NADPH oxydases des cellules non phagocytaires ont une activité de 10 à 100 fois moins élevée que celle des cellules phagocytaires et les ERO qu'elles produisent jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire (Favier., 2003).

L'activité de la NADPH est sensible à des facteurs métaboliques tels que l'hyperglycémie ou la présence d'AGE (Paravicini et Touyz, 2008 ; Anvari et al., 2015).

- *Les ions métalliques*

Comme nous l'avons déjà signalé, les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont des remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro : ils transforment $l'H_2O_2$ en OH^{\cdot} , principalement par la réaction de Fenton (Fontaine., 2007 ; Cotticelli et al., 2013).

4.2. Sources exogènes

L'environnement dans lequel nous vivons tout comme notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation de la production de ROS dans notre organisme et sont générateurs du stress oxydant.

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Priyadarsini., 2005). Les nombreuses sources potentielles de ROS exogènes comprennent :

✓ Les rayonnements UV

Les rayonnements ultraviolets (UV) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants (Afonso et al., 2007). Les UV solaire surtout les UVA (320-400 nm) sont absorbés par des chromophores de la peau qui vont alors être excités pour fournir un oxygène singulet (Gambini et Granier., 2013). Ils réduisent également l'O₂ en anion superoxyde O₂^{•-}, qui sera rapidement transformé par l'enzyme antioxydante la superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui sera réduit à son tour en radical hydroxyle (OH) par la réaction de Fenton. Le radical hydroxyle réagit alors avec les protéines, les lipides et l'ADN (Gambini et Granier., 2013).

✓ Le tabagisme

La fumée de cigarette est un mélange complexe et réactif d'environ 5000 produits chimiques produits par la combustion des ingrédients du tabac (Chalouhi et al., 2012). Elle se compose de deux phases, l'une gazeuse, l'autre solide est constituée de goudrons, qui se caractérisent toutes deux par une concentration très élevée en ROS toxiques (Haj Mouhamed et al., 2012). De plus, la fumée de tabac diminuerait le taux de vitamine A circulante qui est antioxydante. Il en résulte alors une diminution de la protection naturelle contre les EROs (Selby et al., 1991).

L'exposition passive ou active à la fumée de cigarette entraîne la génération d'un stress oxydatif suivi d'une signalisation cellulaire, de l'activation de cascades de protéines kinases et de facteurs de transcription, et de la libération de médiateurs de l'inflammation. L'effet final de cette séquence de réactions est l'inflammation pulmonaire et systémique et l'apoptose (Preedy., 2020 ; Selby et al., 1991). Ainsi, les fumeurs ont une élévation du taux plasmatique de produits issus de la peroxydation lipidique (Petruzzelli., 1990).

✓ L'alcool

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production l'O₂^{•-} (Albano et al., 1994 ; Albano et al., 1999). Selon ces mêmes auteurs, l'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P450.

Ainsi, l'alcool diminue selon (Schisler et Singh., 1989), l'activité des enzymes de protection antioxydantes (SOD-GSH-Px). Les concentrations sériques en sélénium (oligoélément) et vitamine E (antioxydant) sont également abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère (Servais., 2004).

✓ Les métaux lourds

Certains métaux apportés de manière exogène, mais pouvant être aussi endogènes (Halliwell et Gutteridge., 1990), tels que le mercure, le fer, le cadmium, le nickel, l'arsenic et l'amiante (Mena et al., 2009 ; Wanges et al., 2014) sont nécessaires à l'organisme mais peuvent à des taux élevés générer des ROS, en participant à la réaction de Fenton. Ces métaux de transition peuvent, en effet, réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de composé organique (RH) et générer des ROS (Halliwell et Gutteridge., 1990).

✓ L'ozone (O3)

L'ozone (O3) est un gaz très réactif formé par réaction photochimique dans l'air à partir d'oxydes d'azote (NOx) et de composés organiques volatiles. L'ozone possède deux électrons libres et interagit avec les composés du fluide périciliaire qui recouvre l'épithélium bronchique. L'ozone est peu hydrosoluble et interagit avec les antioxydants présents dans le fluide comme la vitamine C, l'acide urique et le glutathion réduit donnant le glutathion oxydé. L'O3 favorise aussi la migration des polynucléaires neutrophiles à la surface de l'épithélium respiratoire par chimioattraction, cela favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'exposition à l'O3 peut également provoquer des aberrations chromosomiques dues à une attaque directe par l'O3 ou par d'autres RL générés à la suite de ses réactions (Preedy., 2020). Il est ainsi à l'origine d'une réponse inflammatoire favorisant le stress oxydant (Baeza and Marano., 2007).

✓ Herbicides, Pesticides

L'exemple le plus connu est le paraquat, utilisé comme herbicide. Il s'agit d'une molécule stable comprenant deux pyridiniums (Houze., 1990). En présence de NADPH-cytochrome P450 réductase, ce composé toxique passe sous forme radicalaire qui est stabilisé par la délocalisation de l'électron célibataire sur les structures pyridiniques composant le paraquat. Ensuite il y aura une production du radical superoxyde par la régénération qui se fait par transfert de l'électron libre à une molécule d'oxygène (Bus and Gibson., 1984 ; Bus et al., 1994).

La toxicité du paraquat est donc due à la production de radicaux libres qu'il entraîne d'autant plus qu'il a une capacité à se régénérer. Si les quantités de ce radical sont trop importantes, les voies de détoxification enzymatiques sont saturées et il y a alors développement d'un stress oxydatif. Le radical superoxyde va agir en oxydant les acides gras insaturés et notamment ceux des membranes cellulaires (Steffin., 1996).

5. Cibles biologiques des ROS

En plus des fonctions biologiques, la réactivité particulière des ROS ajoute des propriétés toxiques et diversifiées (Barouki., 2006 ; Valko et al., 2007). En fait, lors d'un stress oxydant (fig.5), les RLs non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Menon., 2014). Ils provoquent aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier., 2003).

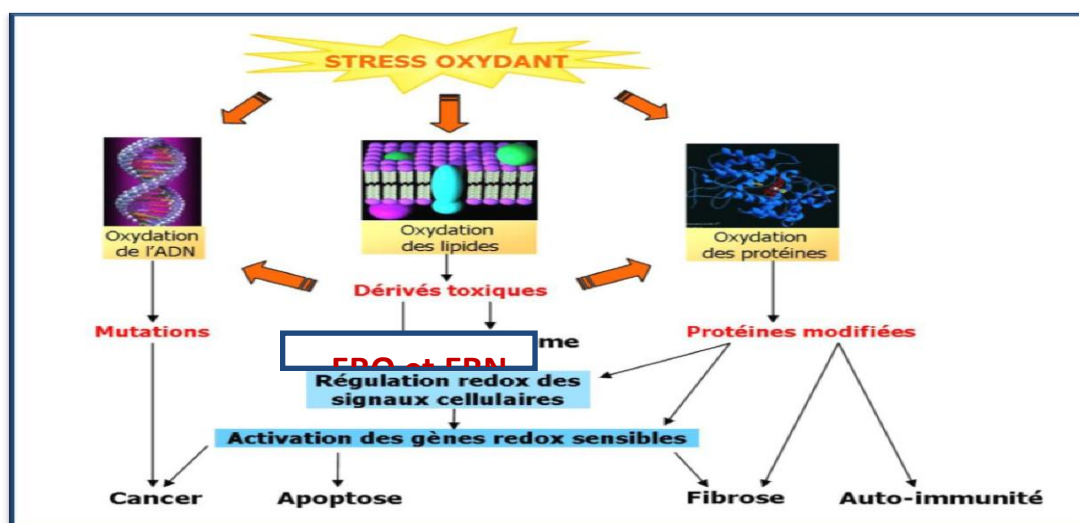


Figure 5 : Effets potentiels du stress oxydant sur les composants cellulaires et sur l'organisme (Letendre., 2009)

5.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides (LPO) est considérée comme le processus le plus dommageable qui se produit chez tous les organismes vivants (Moller et al., 2007). Elle correspond à l'attaque des cibles lipidiques par les EROs (Valko et al., 2006). En fait, les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leur acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Pamplona et al., 2000 ; Hulbert.I, 2005).

Ainsi, la position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés (Dwassy., 2014). Parmi les espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés (Haleng et al., 2007).

Le processus général de LPO (fig.6) consiste en une réaction radicalaire en chaîne qui se déroule en trois phases : initiation, propagation et terminaison (Frankel., 2005 ; Leopold et Loscalzo., 2009) :

❖ **L'initiation** : la réaction commence lorsqu'un acide gras insaturé rencontre une espèce capable d'arracher un atome d'hydrogène et ainsi créer un site radicalaire sur un atome de carbone (radical alkyle). Les espèces initiatrices de la peroxydation lipidique sont principalement des radicaux libres et essentiellement le radical hydroxyle OH° et hydroperoxyde HO_2° (Halliwell et Chirico., 1993).

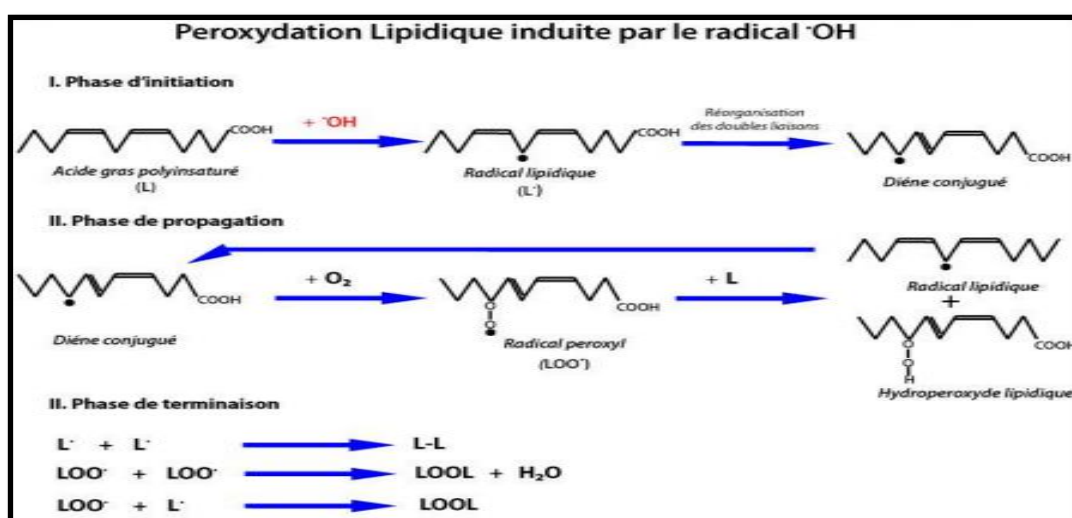


Figure 6 : Réactions de la peroxydation lipidique en chaîne (Halliwell et Gutteridge., 2007)

❖ **La propagation** : cette étape correspond à la fixation très rapide des radicaux libres alkyles (R°), issus lors de l'initiation, avec l'oxygène moléculaire à l'état normale. Il se forme des radicaux libres peroxydés (ROO°) instables pouvant réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras insaturée pour former des lipides hydroperoxydes susceptibles d'être décomposés en d'autres espèces réactives (Davies. 2000 ; Fam et Morrow., 2003).

❖ **La terminaison** : les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution, être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase (enzyme antioxydante) et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (Luc et al., 1991 ; Halliwell., 1996 ; Favier, 2003), ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messages secondaires toxiques qui augmente les dommages initiaux dus aux radicaux libres (Marnett., 1999).

Parmi les aldéhydes formés : l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Echtay et al., 2003). Les deux derniers produits (MDA, 4HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule (Marnett., 1999).

La peroxydation lipidique est suivie d'un changement structural des membranes biologiques (Pacifici et al., 1994), ou d'autres éléments contenant des lipides (Niki et al., 2005 ; Stark., 2005 ; Al-Mutairi et al., 2007). Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules (Bonfont-Rousselot., 1994).

5.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS (Levine., 2002). Ces ROS sont, en effet, capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines (fig.7), altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont (Koechlin-Ramonatxo., 2006) :

- Les acides aminés aromatiques : comme le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels le radical OH^{*} s'additionne, modifiant la conformation de la protéine ;
- Les acides aminés contenant un atome de soufre tels que : la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines.

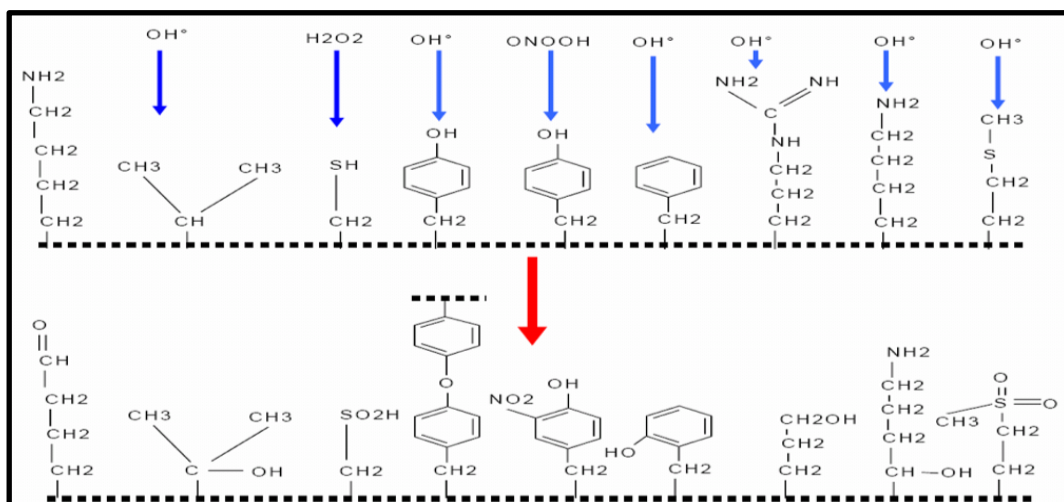


Figure 7 : Nature de quelques modifications des chaînes d'acides aminées des protéines après attaque radicalaire (Favier., 2003)

Les ROS sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Par ailleurs, le radical OH[•], mais aussi l’anion superoxyde O₂^{•-}, s’attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. L’oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique (Koechlin-Ramonatxo., 2006). Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement à un ligand, altérant ainsi la signalisation cellulaire (Favier., 2003).

5.3. Oxydation de l’ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il existe au sein de la cellule deux « types » d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de séparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources d'ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter et al., 1988).

L’ADN est une molécule très sensible à l’attaque par les RLs (fig.8). L’attaque radicalaire peut entraîner l’oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Burton et Jauniaux., 2011 ; Charbon et al., 2014).

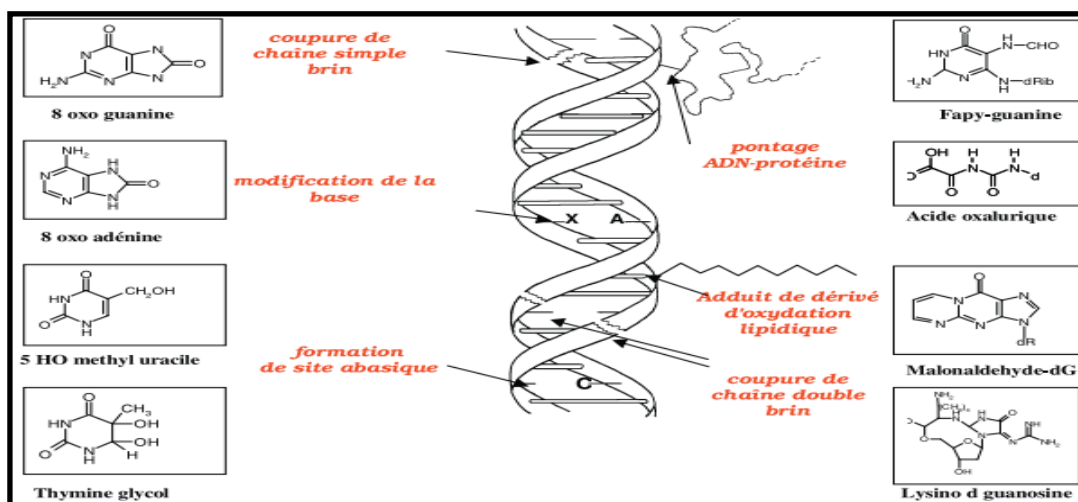


Figure 8 : Lésions de l’ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier., 2003)

En outre, la base guanine est principalement touchée par les phénomènes d'oxydation de l'ADN. La guanine va réagir avec le radical hydroxyle (fig.9) pour former du 8- hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG). Ce dernier, va alors s'apparier avec l'adénine au lieu de la cytosine, ce qui va induire des mutations au sein de l'ADN (Haleng et al., 2007). Le radical hydroxyle peut aussi réagir avec les groupements aromatiques des bases d'ADN (Nikitaki et al., 2015).

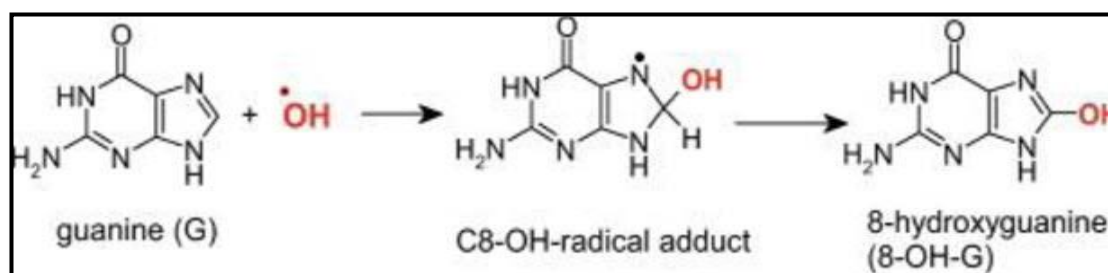


Figure 9 : La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle (Jomova et al., 2011)

Des dommages indirects peuvent également résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine (Cadet et al., 2002).

Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Certaines enzymes permettent la réparation directe de l'ADN. La réparation de l'ADN peut se faire également par excision des bases endommagées, celles-ci sont remplacées en utilisant le brin intact comme matrice. Cependant, si les dommages sont trop importants, la cellule va entrer en apoptose ou dans un cycle de division cellulaire non contrôlé aboutissant à la formation de tumeurs cancéreuses (Nikitaki et al., 2015).

Mesurer les dommages de l'ADN peut s'avérer être délicat du fait du faible taux de dommage. Il existe plusieurs méthodes permettant d'effectuer ces mesures. Certains anticorps sont utilisés permettant de détecter les modifications au niveau de l'ADN (Nikitak et al., 2015). Il est possible aussi d'utiliser des enzymes de réparation de l'ADN qui vont convertir les lésions de l'ADN en cassure. Les brins d'ADN sont ensuite séparés par électrophorèse ou par élution (Nikitak et al., 2015 ; Pflaum and Epe., 2000). Enfin, certaines techniques de chimie analytique (HPLC) peuvent être utilisées pour mesurer les dommages de l'ADN (Oshima et al., 2002).

6. Antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «Antioxydant» :

6.1. Définition

Le terme antioxydant désigne toute molécule ayant la capacité de diminuer ou d'arrêter l'action d'espèces réactives oxygénées, soit directement en inhibant leur production ou bien en limitant leur propagation en agissant comme des piègeurs de radicaux libres pour donner finalement des composés stables (Favier, 2003). Les espèces antioxydantes peuvent se définir donc comme des substances qui sont capables de neutraliser les formes actives de l'oxygène et qui permettent de maintenir, au niveau de la cellule et de l'organisme, des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres entre autres, elle diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques (Halliwell, 1994).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi aux petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous organismes, qu'ils soient intracellulaire, membranaires ou extracellulaires (Cano et al., 2006).

Les systèmes antioxydants présents dans l'organisme sont, soit d'origine endogène, soit exogène. On distingue également les antioxydants enzymatiques des antioxydants non enzymatiques (Niki, 2010). Les antioxydants peuvent donc être produits de façon endogène ou provenir de sources exogènes, comme l'alimentation ou les suppléments antioxydants (Vertuani et al., 2004).

6.2. Mode d'action des antioxydants

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. (Penna et al., 2009). En fait, en fonction de leur mécanisme d'action on distingue des antioxydants inhibiteurs des radicaux libres, décomposeurs des peroxydes, désactivateurs des ions métalliques, ou des piègeurs d'oxygènes (Dziezak, 1986 ; Yagi, 1970). En complément de ces mécanismes, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Penna et al., 2009).

6.3. Les systèmes de défense antioxydants

6.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de l'organisme contre les ERO (Khither, 2020). Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) (Vincent et al., 2004) :

- *La Superoxyde dismutase (SOD)*

La superoxyde dismutase (SOD) est une protéine métallique possédant une activité enzymatique lui permettant de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Russo-Marie, 1998). Il existe plusieurs SOD, elles diffèrent par le ou les métaux présent(s) dans sa structure qui va (vont) permettre la liaison enzyme-ligand (fig.10) :



Figure 10 : Structure tridimensionnelle du superoxyde dismutase (Andrew, 1989)

La réaction chimique catalysée par la SOD nécessite un milieu acide et va permettre d'agir simultanément avec 2 anions superoxydes aboutissant à la formation de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène :



La dismutation du radical superoxyde est spontanée, mais l'action de la SOD permet de l'accélérer 10 000 fois (Mccord et Fridovic, 1988).

La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz et al., 2001).

- **La Catalase (CAT)**

La catalase (fig. 11) est un homotétramère de 59 KDa, comportant 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémunique avec Fe^{3+} lié au site actif. La fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Powers et Jackson, 2008) :

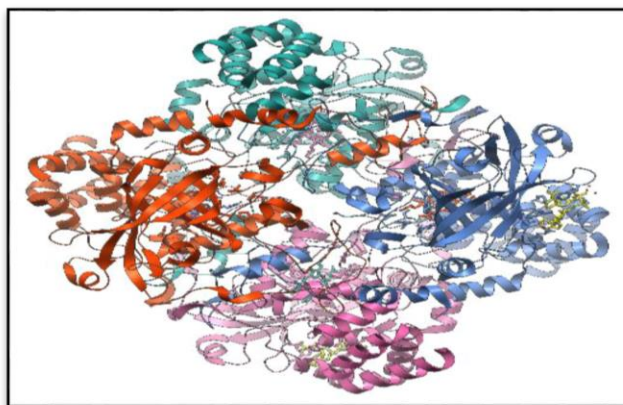
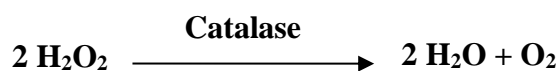


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la catalase (Skotheim, 1986)

Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant :



Sa vitesse de réaction est uniquement dépendante de la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme ce qui, en fait, en fait une des enzymes les plus efficaces connues (Delattre et al., 2005).

La CAT est particulièrement présente dans les érythrocytes, le foie et parfois les reins plus particulièrement au niveau des peroxysomes (Quan et al., 1986 ; Kodydková et al., 2014). L'activité de la catalase est augmentée lorsque le niveau du stress oxydatif est élevé ou la quantité de glutathion peroxydase est faible. Elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse s'amplifier (Cantin, 1999).

- *La Glutathion peroxydase (GPx)*

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxyperoxydes. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries (Richard et al., 1997). Elle est constituée de 4 sous-unités (fig. 12) contenant chacune un atome de sélénium. Il existe 5 isoformes de cette enzyme variant suivant leur localisation dans l'organisme.

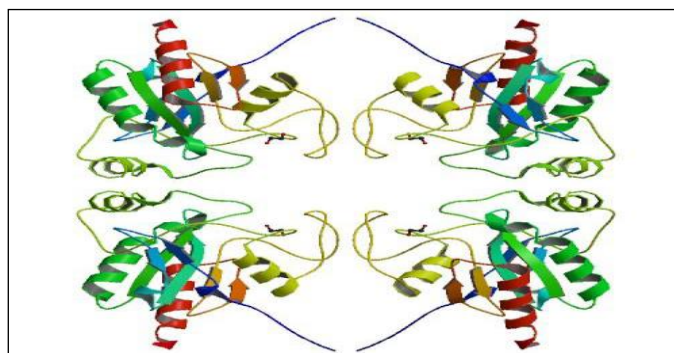


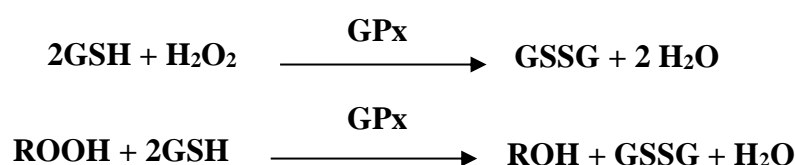
Figure 12 : Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase (Lyons et al., 1990)

Cette enzyme constitue la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes. Cette fonction antioxydante est d'autant plus importante qu'elle joue un rôle essentiel avec les superoxydes dismutases et la vitamine E (Frie et al., 1988). Elle va donc assurer l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro-/antioxydants.

La GPx est en compétition avec la CAT car elles utilisent toutes les deux le même substrat : H_2O_2 , la GPx étant active pour des faibles concentrations d'EROs (Valko et al., 2006). Elles permettent de réduire H_2O_2 en H_2O (Thérond, 2003).

Cette réaction de réduction des peroxydes nécessite l'oxydation de deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion-disulfure (GSSG) (Mates et al., 1999 ; Powers et Lennon, 1999). Le GSSG ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Foyer et al., 2008 ; Lonn et al., 2012).

En présence de substrat de type ROOH, la réaction se traduit de la manière suivante avec la formation d'une molécule d'eau et d'une molécule d'alcool (Desmier, 2016) :



Le schéma ci-dessous présente les réactions mises en jeu pour la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase (GPx) :

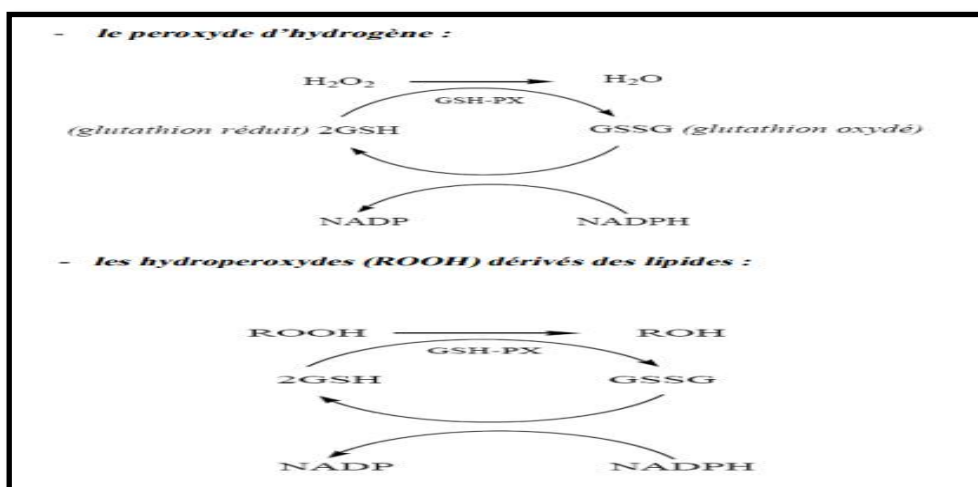


Figure 13 : Cycle de détoxification par la glutathion peroxydase

6.3.2. Les systèmes antioxydants non-enzymatiques

Dans ce groupe d'antioxydants on peut distinguer deux types : les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes (Ribeiro et al., 2001) :

6.3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogènes

Ce groupe d'antioxydants renferme de nombreuses molécules endogènes synthétisées par les cellules :

- *Le Glutathion (GSH)*

C'est un tripeptide formé de glycine, cystéine et de glutamate. Il appartient au groupe des thiols parmi les plus abondants dans la cellule, et présent en concentrations millimolaires (Raman et Berry, 2011). On le retrouve dans de nombreux compartiments intracellulaires (cytosol, noyau, mitochondries) soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GS-SG) (Desmier, 2016).

Le glutathion réduit (GSH) est le substrat indispensable aux réactions qui éliminent les peroxydes à partir de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx), de la glutathion transférase (GST) et de la glutathion réductase (GR). Au cours de l'oxydation du glutathion (fig.14), deux molécules de GSH se lient en formant un pont disulfure (S-S) par l'oxydation du groupement -SH de chaque cystéine. De cette réaction résulte la formation de glutathion oxydé ou disulfide (GSSG) (Dwassy, 2014).

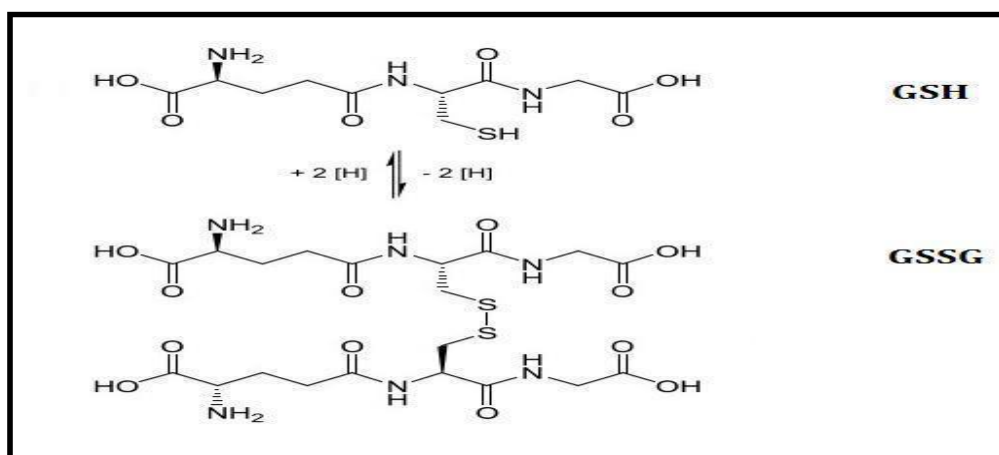


Figure 14 : État d'oxydation du glutathion (Raman et Berry, 2011)

Le glutathion peut aussi réduire les niveaux de peroxydation lipidique, les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C et peut chélater les métaux de transition (Power et Lennon, 1999 ; Packer et al., 2001).

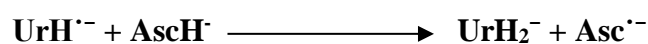
Outre la défense antioxydante, il est impliqué dans de nombreuses fonctions comme la régulation de l'apoptose et de l'immunité ainsi que des mécanismes de détoxification, mais aussi la modulation de la prolifération cellulaire (Alcaraz et al., 2013).

Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car, plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et Fu, 1992).

- ***L'Acide urique***

L'acide urique est produit par oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. Il est ensuite oxydé par l'urate oxydase en allantoiné puis finalement en acide allantoiné et urée. À pH physiologique, l'acide urique est majoritairement ionisé sous forme d'urate, en raison de pKa de 5,4 (Simic et Jovanovic, 1989).

L'urate (UrH_2^-) est capable de réagir avec les radicaux OH^\cdot . Cette réaction conduit à la formation d'une espèce radicalaire $\text{UrH}^{\cdot-}$ qui est relativement stable (Simic et Jovanovic, 1989). Ce radical peut être à son tour réduit par l'ascorbate, régénérant ainsi l' UrH_2^- et limitant l'action du radical urate avec d'autres cibles (Simic et Jovanovic, 1989 ; Maples et Mason, 1988).



L'acide urique réduit aussi, les radicaux peroxydes et neutralise l'anion superoxyde (Ames et al., 1981 ; Simic et Jovanovic, 1989). Il joue également le rôle d'un chélateur des ions métalliques, qui sont impliqués dans la génération prooxydante (Strazzullo et Puig, 2007).

En outre, des scientifiques japonais ont mis en exergue la capacité de l'acide urique à stopper les réactions d'oxydation en chaîne des lipides, en réagissant avec les radicaux lipidiques formés (Patterson et al., 2003).

- **La Coenzyme Q10**

La coenzyme Q10, également appelée ubiquinone (fig.15) en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines (Langsjoen et Langsjoen, 2003).

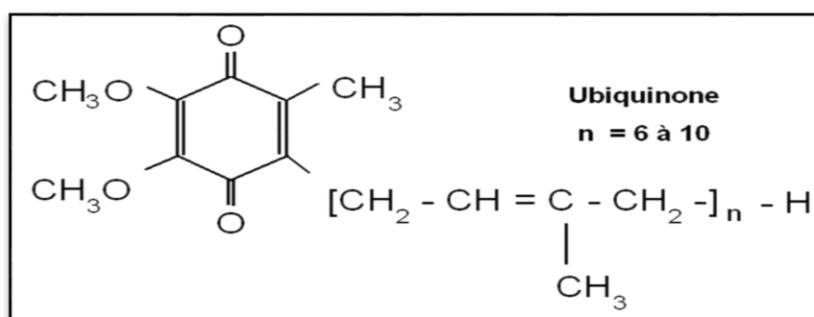


Figure 15 : Structure chimique des ubiquinones (Haleng et al., 2007)
n peut varier de 6 à 10)

La coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Elle est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers et Jackson, 2008). Elle assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Ernster et Forsmark-Andree, 1993).

Il est à noter que la synthèse de cet antioxydant est, en tout point, parallèle à celle du cholestérol. La formation de ces deux molécules dépend, en effet, de l'acide mévalonique formé à partir de la transformation de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG CoA) par la HMGCoA réductase (Langsjoen, 2003).

- ***La bilirubine***

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules du système réticuloendothéliale (foie, rate et moelle osseuse) chez les mammifères.

La bilirubine est un composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stoechiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. Elle est capable de piéger des radicaux $RO_2\cdot$ et l^1O_2 et protéger l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

- ***La mélanine***

Les mélanines sont des pigments formés par oxydation et polymérisation de la tyrosine, grâce à l'action d'enzymes (tyrosine hydroxylase et tyrosinase). Les produits terminaux de polymérisation contiennent de forte concentration d'O-quinone (espèce oxydante) et O-hydroquinone (espèce réductrice) ainsi que des semiquinones.

Les mélanines noires et marron présentent dans la peau protègent des rayonnements ultraviolets. Elles se comportent comme des piègeurs des RL (en particulier d' $O_2^{\cdot-}$ qui est produit lors d'illumination de la mélanine et de $RO_2\cdot$) (Korytowski et al., 1986). Les mélanines joueraient également un rôle antioxydant dans la substantia nigra (zône du cerveau atteinte de la maladie de Parkinson) et dans la rétine (Dellatte et al., 2005).

- ***La mélatonine***

La mélatonine est une hormone produite par la glande pinéale, par méthylation de la sérotonine, dont le rôle est de réguler les rythmes circadiens. La concentration de mélatonine est basse le jour et s'accroît la nuit. In vitro, la mélatonine présente des propriétés antioxydantes, mais à des concentrations nettement supérieures (106 fois supérieures) à celles présentes in vivo (Wakatsuki et al., 2000). Elle est capable de piéger, en effet, plusieurs espèces radicalaires, mais sa capacité à rompre les chaînes de peroxydation lipidique est limitée.

- ***Les hormones sexuelles***

Les hormones sexuelles femelles (œstradiol, œstrone et oestriol) sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique des LDL in vitro à des concentrations micromolaires (Keaney et al., 1994). Ce pouvoir antioxydant est lié à la présence d'un hydroxyle phénolique dans leur structure chimique, particularité commune avec la vitamine E et responsable de leur capacité à interrompre des chaînes de peroxydation lipidique. Ceci pourrait être en rapport avec l'effet bénéfique de

l'administration d'œstrogènes, dans le cadre d'une hormonothérapie substitutive chez la femme ménopausée, vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Susuki et al., 2003).

Cependant, l'activité antioxydante des œstrogènes s'accompagne de la formation d'un radical phénoxy dont la toxicité peut ne pas être négligeable puisqu'il est à son tour capable d'attaquer des cibles moléculaires telles que les protéines ou l'ADN (Liehr, 1996).

6.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes

Ce système fait appel à des molécules non enzymatiques telles que les vitamines antioxydante (vitamine C et vitamine E), les caroténoïdes et les composés phénoliques. Contrairement aux enzymes antioxydants, ces composés ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (Gardès-Albert et al., 2003).

- *La Vitamine E*

La vitamine E (fig.16) est une vitamine liposoluble présente en grande quantité dans les huiles végétales (e.g, l'huile de palme, d'olive et de tournesol). La vitamine E est en réalité formée de huit composés chimiques différents regroupés en deux sous-ensembles en fonction de la présence de groupements de substitution et de doubles liaisons. Nous trouvons donc le sous-ensemble des tocopherols (α -, β -, γ -, ou δ -tocopherol) et des tocotrienols (α -, β -, γ -, ou δ -tocotrienol).

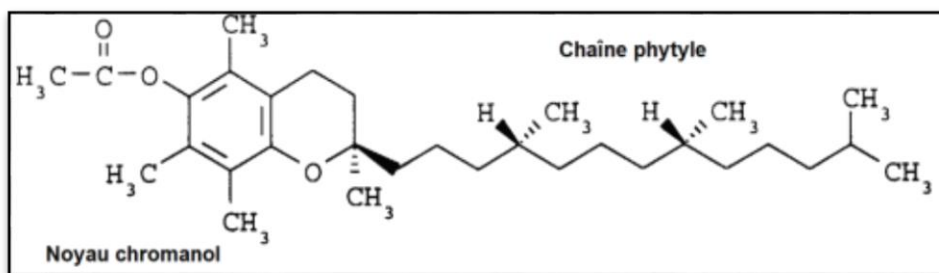


Figure 16 : Structure chimiques des vitamines E (Lopez et al., 2005)

La vitamine E ou α -tocophérol (α -TOH) est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile, correspondant au noyau chromanol et une extrémité hydrophobe (chaîne phytyle). L' α -TOH est le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque particule LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules d' α -TOH. Elle est incorporé dans les particules de LDL au cours de leur métabolisme, grâce à une protéine appelée protéine de transfert de l' α -TOH (ou α -tocophérol transfer protein) (Lopez et al., 2005).

Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -TOH, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2^\cdot , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Lopez et al., 2005).

L' α -TOH, en cédant son hydrogène, se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité. L' α -TOH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical $^\cdot OH$, inhibant ainsi la formation du radical RO_2^\cdot .

La réaction de la vitamine E avec l'anion $O_2^{\cdot -}$ est très lente et par conséquent peu probable. L' α -TOH peut aussi réguler à la hausse les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GPx, la CAT du foie, la GST et la NADPH réductase (Lopez et al., 2005).

La régénération de l' α -tocophérol (fig.17), se fait selon 2 voies : soit par la vitamine C, soit en mettant en jeu la tocophéryle réductase qui en présence de GSH redonne de l' α -tocophérol (Brigelius-Flohe et al., 1999) :

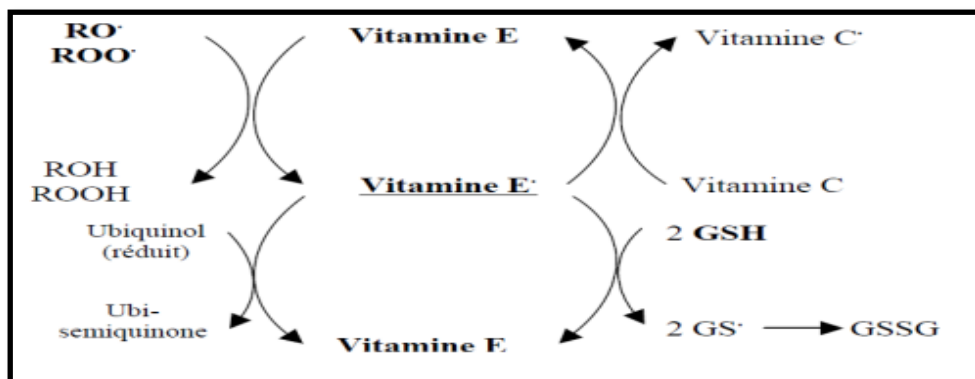


Figure 17 : Régénération de la vitamine E (Chan, 1991)

- **La Vitamine C**

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans de nombreux fruits comme les oranges, les citrons et les fraises. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire (Fabre et al., 2015). L'acide L-ascorbique ou vitamine C (fig.18) est présent le plus couramment sous forme d'anion ascorbate ($Asc-H^-$: forme présente dans le milieu physiologique).

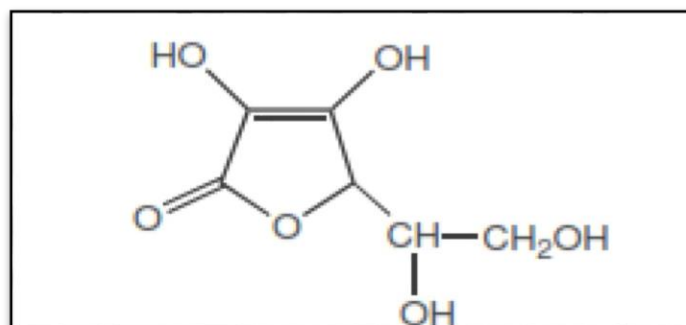
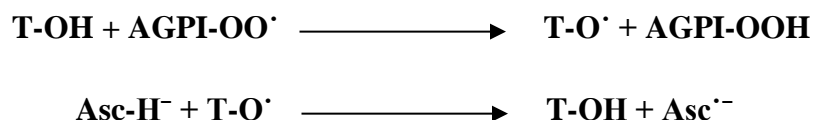


Figure 18 : Structure chimique de la vitamine C (Diallo, 2005)

La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra et extracellulaires (compartiments hydrophiles). Elle agit principalement en piégeant directement les ERO (majoritairement l' $O_2^{\cdot -}$ et l' $ONOO^-$). Elle est aussi capable de recycler l' α -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique (Vertuani, 2004) :



Ses activités biologiques antioxydantes viennent de son potentiel réducteur puissant ($E^{\circ} = 0,29 \text{ V}$). Par interaction avec un radical lipidique R^{\cdot} , la vitamine E (T-OH) se transforme en un radical tocophéryle (T-O $^{\cdot}$). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la vitamine C (Asc-H $^-$) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Asc $^{\cdot -}$).

Toute fois la vitamine C est capable de piéger des radicaux libres mais son intérêt majeur en terme de pouvoir antioxydant réside en sa capacité à régénérer la vitamine E au sein de la membrane (Fabre et al., 2015).

- **Les Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont un groupe de pigments naturels et sont synthétisés par les plantes et les micro-organismes (Mehta et al., 2015). Ils sont présents dans les compartiments lipidiques car ils sont plutôt lipophiles. Les caroténoïdes sont apportés par l'alimentation, les aliments les plus riches sont la carotte (α -carotène, β carotène), la tomate, le melon (lycopène), les agrumes (β -cryptoxanthine), les épinards, l'endive (β -carotène et lutéine) et le maïs (zéaxanthine). On les

retrouve aussi dans le foie et les huiles de foie de poisson, le lait entier et les œufs (Amandine, 2016).

Il existe principalement deux groupes de caroténoïdes qui sont des puissants neutraliseurs des EROs : ceux porteurs de substituants oxygénés (lutéine, zéaxanthine et la cryptoxanthine) et ceux qui n'ont pas d'oxygène (α -carotène, β -carotène et lycopène) (Amandine, 2016).

Leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation d'espèces électroniquement activées telles l' $^1\text{O}_2$ et la désactivation d'espèces chimiques réactives telles les radicaux peroxy ($\text{ROO}\cdot$) et alkyles ($\text{R}\cdot$) (Delattre et al., 2005), du fait de la capacité de la structure à double liaison conjuguée, à délocaliser les électrons non appariés (Flora, 2009).

- ***Les polyphénols***

Les polyphénols représentent une classe de métabolites secondaires. Ils sont très largement représentés dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Nous les consommons sous forme de fruits ou de légumes par exemple. Leur structure (fig.19) comporte un ou plusieurs groupes phénoliques (e.g un groupement OH greffé sur un noyau aromatique) :

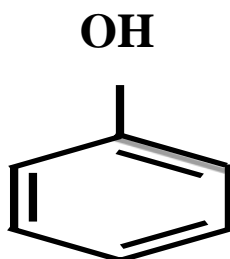


Figure 19 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces (Scalbert et Williamson, 2000).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger directement les radicaux libres, d'inhiber les ions métalliques et les enzymes impliqués dans la production des EOR et de protéger les systèmes de défense antioxydants (Halliwell, 1994).

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox,

les polyphénols (Ar-OH) sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes (ROO[•]), les alkoxydes (RO[•]) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène ou d'électron (Dugas et al., 2000 ; Pietta, 2000).

- *Les oligo-éléments*

Les oligo-éléments se définissent comme une classe de nutriments nécessaires, en quantité très faible, à la vie d'un organisme. L'apport par l'alimentation, en quantité raisonnable, est crucial.

Les oligoéléments servent de cofacteurs aux enzymes antioxydants, ont aussi des propriétés antioxydantes. Des métaux tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et dans certains micro-organismes le nickel (Ni) et le fer (Fe), jouent un rôle important en tant que catalyseur de la SOD. De la même façon le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont les éléments catalyseurs de la GPx et la catalase, respectivement (De moffarts et al., 2005).

7. Stress oxydant et pathologies humaines

Le stress oxydant (SO) est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par le SO apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur exprimant certains gènes, le SO sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, sclérose latérale amyotrophique, vieillissement accéléré. Le SO est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires.

Les causes essentielles de ce SO sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène. La responsabilité la plus nette des RL est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de

la Cu/Zn-SOD ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique (Favier, 2003).

7.1. Exemples des maladies liées au SO

7.1.1. Diabète

Le diabète sucré est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique et une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique. Il résulte d'une déficience de la sécrétion et/ou de l'activité de l'insuline. La majorité des cas de diabète sont représentés par les diabètes de type 1 et de type 2 (respectivement environ 15% et 80% des cas), le reste étant constitué par des formes plus rares représentant moins de 5% des cas (Bonfont-Rousselot et al., 2004).

Un état de stress oxydant a été décrit dans le diabète ; il s'agit d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), en particulier des radicaux libres, et les défenses antioxydantes. Ce stress oxydant pourrait être impliqué dans les atteintes tissulaires et pourrait représenter un nouveau facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires au cours du diabète de type 2.

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la genèse d'un stress oxydant dans des conditions d'hyperglycémie chronique : auto-oxydation du glucose, surproduction de radicaux superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale et par activation de la NAD(P)H oxydase vasculaire, voie des polyols, et formation de produits de glycation avancée (AGE).

Le gradient de protons généré par la chaîne mitochondriale de transport des électrons conduit à une production intracellulaire de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), au niveau de deux sites principaux : la NADH deshydrogénase du complexe I, et l'interface entre l'ubiquinone et le complexe III. Cette surproduction de superoxyde est accrue en présence de fortes concentrations de glucose qui sont susceptibles d'induire la synthèse de diacylglycérol ou l'hydrolyse des phosphatidylcholines, activant ainsi la protéine kinase C (PKC).

Par ailleurs, les cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses sont capables de produire des ERO via l'activation des NAD(P)H oxydases (Jones et al., 2000).

Ainsi, une production accrue de sorbitol par la voie des polyols a lieu en présence de concentrations élevées de glucose. Cette voie est importante à noter car elle conduit à une déplétion intracellulaire de NADPH puisque ce dernier est nécessaire à l'activité de l'aldose réductase (fig.20) :

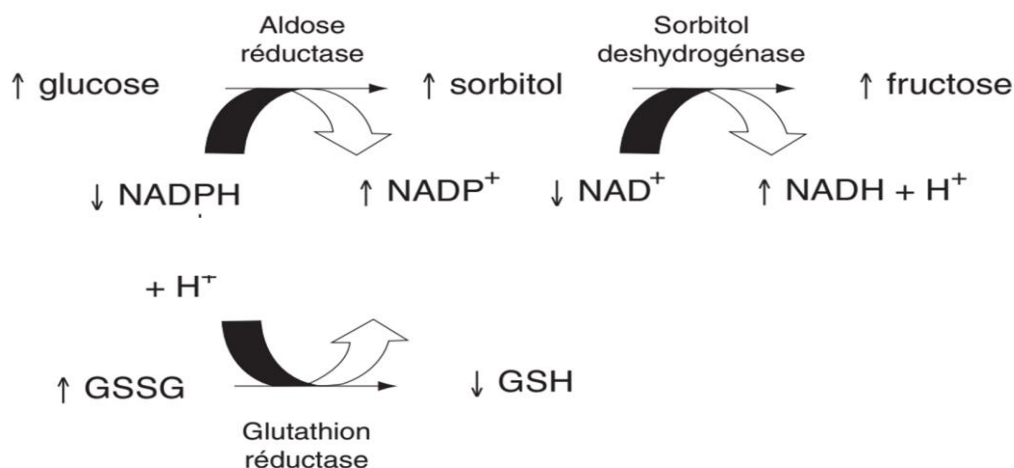


Figure 20 : Voie des polyols et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot et al., 2004)

Le déficit intracellulaire de NADPH a pour conséquence une faible régénération du GSH à partir du GSSG. La diminution du rapport $NAD^+/NADH$ conduit par ailleurs à une chute de l'activité glycolytique (Packer et al., 2001).

Une autre source d'ERO est la production accrue d'AGE ou produits de Maillard (Singh et al., 2001). Les AGE sont capables de produire des RL oxygénés par des mécanismes biochimiques complexes. Ils interagissent avec des récepteurs spécifiques (RAGE) et induisent un SO (Ceriello, 2000).

Il est intéressant de souligner que, si l'hyperglycémie chronique est bien à l'origine d'un SO, ce dernier pourrait être aussi à l'origine du diabète de type 1 par un phénomène d'apoptose des cellules bêta pancréatiques (Traverso et al., 1997) ou à l'origine de l'insulino-résistance du diabète de type 2 (Baynes et Thorpe, 1999).

7.1.2. Athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie de plus en plus courante, c'est la première cause d'infarctus du myocarde et du cerveau. L'athérosclérose est la conséquence de la formation des

plaques d'athérome à l'intérieur de l'artère qui conduisent à l'obstruction de l'artère (Lee et al., 2012). Cette pathologie inflammatoire se caractérise par un épaissement de la paroi des artères au niveau de l'intima (fig.21) :

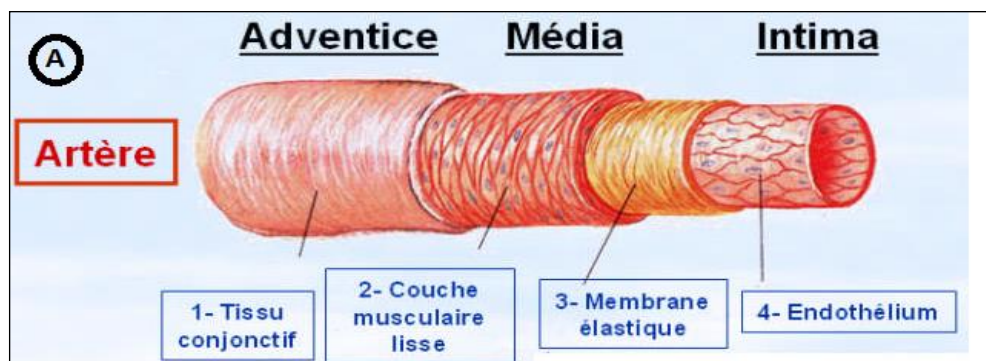


Figure 21 : Structure de la paroi artérielle (Bruneval, 2003)

L'athérosclérose est définie selon l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media ». L'athérosclérose aboutit à la formation de plaques au niveau de la paroi des artères, qui sont composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol (athérome) enveloppés dans une gangue fibreuse (sclérose) (Lusis, 2000).

L'oxydation lipidique due au stress oxydatif joue le rôle principal dans la formation des plaques d'athéromes. En effet, les cellules endothéliales sécrètent des ERO au niveau de la paroi vasculaire. D'une part, l'accumulation des ERO endommage les structures cellulaires et change le profil transcriptionnel des cellules présentes au niveau de la paroi vasculaire et d'autre part, les ERO induisent l'oxydation des lipides présents au niveau du site vasculaire.

Les lipides oxydés seront reconnus par le système immunitaire comme étant des substances étrangères, ce qui favorise leur accumulation massive par les macrophages qui se transforment alors en cellules spumeuses. L'oxydation des lipides crée une inflammation au niveau de l'endothélium et déclenche le recrutement des monocytes permettant la formation de stries graisseuses. La libération des cytokines par les macrophages et les cellules endothéliales favorise le maintien et l'amplification de l'inflammation et conduit ainsi à la formation d'une plaque d'athérosclérose (Lee et al., 2012).

7.1.3. Insuffisance cardiaque (IC)

L'IC correspond à l'incapacité du coeur à répondre à la demande métabolique. Elle est la résultante d'un déséquilibre entre la demande de l'organisme et les capacités de la pompe cardiaque. La multiplicité des facteurs de risque d'IC illustre bien que ce déséquilibre peut être d'origine multiple : diminution de la délivrance d'oxygène (hypoxie chronique, athérosclérose, insuffisance coronarienne), augmentation de la charge de travail (HTA), altération structurale ou insuffisance de production d'ATP.

Le stress chronique du myocarde, engendré par ces différentes situations pathologiques, entraîne une réponse adaptative. Elle comprend l'hypertrophie myocardique du VG, le remodelage fonctionnel et l'adaptation métabolique. Mais quand le stress dépasse les capacités adaptatives ou quand il est prolongé, il entraîne une hypertrophie « maladaptative », une dilatation progressive du VG, des anomalies de contraction et la défaillance cardiaque (Duparc et al., 2011).

Le SO est apparu comme un facteur impliqué dans la progression de l'IC. Il serait à l'origine de l'induction de l'apoptose myocytaire ou encore de l'hypertrophie cardiaque (Monteil et al., 2004). En fait, la mitochondrie est le site principal de production des ERO mais également la cible privilégiée de leurs actions délétères, et joue, à ce titre, un rôle important dans la pathologie cardiaque. Ceci a été montré dans l'insuffisance cardiaque expérimentalement par Ide et al en 1999, ayant observé une augmentation de la production mitochondriale d'anions superoxyde associée à un blocage du transport des électrons au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire.

C'est ainsi que la peroxydation lipidique produit des aldéhydes tels que l'HNE dont il a été montré qu'il pouvait inactiver l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale (Benderdour et al., 2003). L'altération de cette enzyme clé du métabolisme énergétique myocytaire intervient précocement au cours du développement de l'hypertrophie cardiaque (Benderdour et al., 2003) et suggère fortement l'implication du SO dans les altérations métaboliques observées au cours de l'IC. L'ADN mitochondrial peut également être touché et contribuer au dysfonctionnement myocytaire (Ide et al., 2001).

7.1.4. Insuffisance rénale aiguë (IRA)

L'IRA désigne un syndrome caractérisé par une diminution rapide (en heure ou en jour) des capacités du rein à éliminer les déchets, à réguler le volume extracellulaire et à maintenir l'homéostasie acidobasique et électrolytique. Cette perte des capacités d'épuration rénale se

manifeste cliniquement par l'accumulation des produits finaux du catabolisme azoté (urée et créatinine). Les autres manifestations cliniques classiques de l'IRA comprennent une baisse de la diurèse, l'accumulation d'acides non volatils et l'augmentation de la kaliémie (Bagshaw et Bellomo, 2007).

L'ischémie/reperfusion est la principale cause de l'IRA. Elle est responsable de lésions structurelles et biochimiques majeures qui surviennent principalement lors de la reperfusion (provoquant la production d'ERO). Les lésions structurelles touchent l'endothélium, mais aussi les cellules épithéliales tubulaires. Les modifications biochimiques sont l'expression d'une cascade de réactions de type SO. Toutes ces modifications s'associent à une activation des processus non spécifiques de l'inflammation. (Bagshaw et Bellomo, 2007).

Le rôle du SO dans le développement de l'IRA est largement admis. Dans ce schéma physiopathologique, le NO représente le messenger de choix (Walker et al., 2000 ; Chatterjee et al., 2002). Au niveau macroscopique, le SO induit une perméabilité microvasculaire rénale et une inflammation liée à l'accumulation de monocytes-macrophages et de polynucléaires neutrophiles, à une dénaturation des protéines au niveau du rein et à une dysfonction endothéliale (Ysebaert et al., 2000). Les conséquences cliniques sont diverses : la nécrose tubulaire aiguë est dominante (Ysebaert et al., 2000) mais elle peut aussi s'accompagner de glomérulonéphrite (Budisavljevic et al., 2003), de vascularite et d'athérome (Himmelfarb et al., 2002).

Sur un plan microscopique, le SO de l'ischémie/reperfusion entraîne la formation des ERO et de NO, ce qui aboutit à la synthèse d'un métabolite cytotoxique principal : l'ONOO⁻. Cette molécule induit la cascade de la peroxydation des lipides et ainsi une augmentation de la perméabilité des membranes plasmiques, lysosomales, mitochondriales et des lésions de l'ADN (Noiri et al., 2001). Ainsi, l'ONOO⁻, via un phénomène de SO, paraît jouer un rôle central dans l'apparition d'une IRA. La physiopathologie de l'IRA est étroitement liée aux lésions des cellules de l'épithélium tubulaire.

CHAPITRE II. VITAMINE C

II. Vitamine C

1. Généralités et rôles des vitamines

Considérées comme des substances indispensables à la croissance, à la reproduction, au bon fonctionnement de tous les organes du corps et une source nutritive importante que l'homme ne peut pas synthétiser et donc doit être apporté par l'alimentation, les connaissances sur les vitamines ont donc beaucoup progressé ces dernières années.

En fait, les vitamines sont un groupe de composés organiques complexes dont le corps a besoin en petites quantités. Elles sont présentes dans des produits d'origine végétale comme les fruits, les légumes et les huiles et d'origine animale comme les oeufs, la viande et les abats ainsi que les produits laitiers et les poissons (Mansour et Aljoubbeh, 2014).

Les vitamines sont subdivisées en deux groupes en fonction de leur solubilité ; vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) et hydrosolubles (vitamine C et le complexe de la vitamine B). Elles ont toutes un rôle clé à jouer dans le fonctionnement de l'organisme. Elles peuvent avoir une fonction co-enzymatique, c'est-à-dire que ce sont des molécules organiques essentielles pour que certaines enzymes puissent catalyser leurs réactions. Elles peuvent jouer un rôle dans des réactions d'hydroxylation ou d'oxydoréduction. Elles présentent également une action anti-oxydante ou même une fonction de type hormonale (Le Moal et al., 1992).

1.1. L'acide ascorbique (Vitamine C)

La vitamine C, ou acide ascorbique, fait partie des vitamines hydrosolubles, au même titre que les vitamines B. Il s'agit d'un composé organique blanc, cristallin, qui peut être synthétisé à partir du glucose ou d'extrait de certaines sources naturelles telles que le jus d'orange (Mansour et Aljoubbeh, 2014). L'isolement sous forme cristalline de la molécule de vitamine C fut réalisé à partir du jus d'orange, de chou et des glandes surrénales par Albert Szent Györgyi en 1928 (Lemerini, 2006 ; Mansour et Aljoubbeh, 2014).

La vitamine C n'est une vitamine exogène que pour l'espèce humaine, le cobaye, la chauve-souris et les primates. En effet, la plupart des autres espèces synthétise cette vitamine à partir du glucose, par la voie du glucuronate, dans le foie (Linster et Van Schaftingen., 2007). En raison d'une série de mutations du gène codant pour la L-gulono-lactone oxydase, qui catalyse la dernière étape enzymatique de la synthèse de l'ascorbate, les humains ne sont pas capables de synthétiser la vitamine C (Nandi et al., 1997). L'apport alimentaire est donc indispensable.

1.1.1. Structure

Le terme de vitamine C est utilisé comme terme générique pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide L-ascorbique. Ce dernier est également connu sous le nom d'acide L-xylo-ascorbique, la vitamine anti-sorbée et la vitamine C, de formule chimique brute « $C_6H_8O_6$ » et d'un poids moléculaire de 176,13 g/mol (Levine et al., 1995 ; Sies et Stahl, 1995).

La vitamine C est un acide organique dont la structure (fig.22) est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. L'acide ascorbique comporte une fonction γ lactone, une fonction ènediol ($HO-C=C-OH$), support de son activité biologique et qui confère à la molécule des propriétés acides et deux fonctions alcool (Guilland et al., 1998).

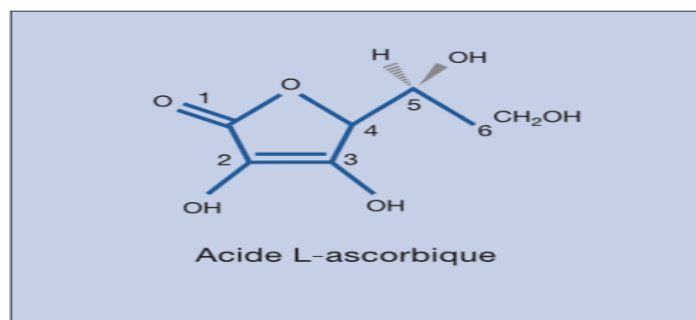


Figure 22 : Structure chimique de l'acide ascorbique

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique sont liées à sa structure (Burtis, 1999). Il se présente sous forme de cristaux blancs, solubles dans l'eau et l'alcool, insolubles dans les solvants organiques. Il s'oxyde de façon réversible en acide déhydro-L-ascorbique (DHA). La forme réduite et la forme oxydée sont en équilibre avec une forme radicalaire, instable, le radical ascorbyle (fig.23).

De plus, les interactions de l'acide ascorbique avec divers produits chimiques et ions métalliques permettent à l'acide ascorbique et son acide déhydro ascorbique (produit de l'oxydation) et son radical de fonctionner pour faire un cycle des couples rédox dans des réactions impliquant le transport d'électrons (D'Agostini et al., 2000).

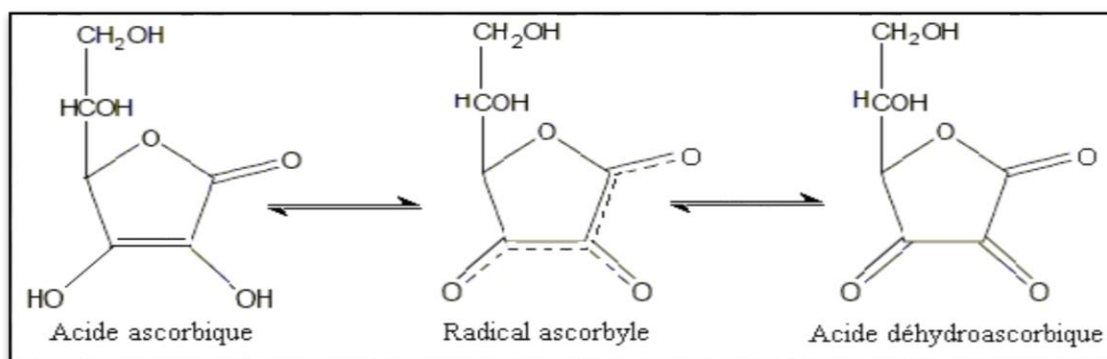


Figure 23 : Forme réduite, forme radicalaire et forme oxydée de la vitamine C

L'agent oxydant habituel de l'acide ascorbique est l'oxygène dont l'activité est catalysée par des traces de métaux comme le cuivre et le fer (Davey et al., 2000 ; Horemans et al., 2000 ; Guillard et al., 1998).

Le tableau 2 regroupe les différentes propriétés physico-chimiques de l'acide ascorbique :

Tableau 2 : les différentes propriétés physico-chimiques de la vitamone C :

Formule brute	C ₆ H ₈ O ₆
Pureté	99,0%
Masse moléculaire	176,1241 g/mol
pH	2 – 3
T° de fusion	190° à 192°C
Masse volumique	1,65
Soluble dans l'eau	1g/3 ml (25°C)
Soluble dans l'alcool	1g/40 ml (25°C)

1.1.3. Propriétés oxydo-réductrices et stabilité

L'acide ascorbique est le réducteur du couple redox suivant, acide déhydroascorbique de formule chimique C₆H₆O₆ (noté DHA) / acide ascorbique (noté AA) pour lequel la demi équation redox est :

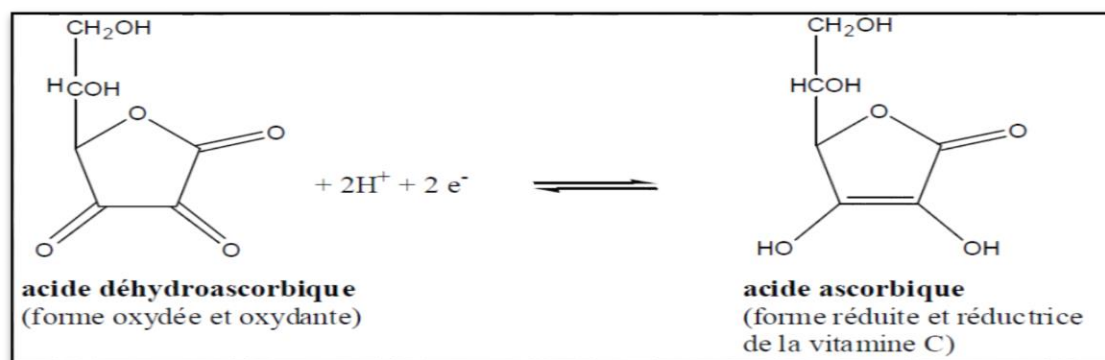


Figure 24 : Forme oxydée et oxydante, forme réduit et réductrice de la vitamine c.

Dans les tissus, il existe un équilibre entre ces deux formes réduite et oxydée qui possèdent la même activité vitaminique.

Cette vitamine est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Par contre, en solution aqueuse, elle s'altère très rapidement au contact du dioxygène de l'air : le dioxygène est un oxydant alors que la vitamine C est un réducteur d'où réaction d'oxydoréduction. Cette oxydation est accélérée par la chaleur (vitamine thermosensible), la présence d'alcalins et d'ions métalliques (Bourgeois, 2003).

1.1.4. Sources alimentaires

La vitamine C n'est pas naturellement synthétisée par le corps humain et donc un apport alimentaire adéquat est nécessaire et essentiel pour un régime alimentaire sain. Les sources naturelles les plus riches en acides ascorbique sont les fruits et légumes frais tels que les agrumes, le cassis, la goyave, le piment ou le persil.

La stabilité et la teneur en vitamine C des aliments peuvent être réduit par un stockage prolongé et par la cuisson car l'acide ascorbique est soluble dans l'eau et est détruit par la chaleur. La cuisson à la vapeur ou les micro-ondes peut réduire les pertes de cuisson. Heureusement, bon nombre des meilleures sources alimentaires de vitamine C, comme les fruits et légumes, sont habituellement consommés crus. En effet, la consommation de cinq portions variées de fruits et légumes par jour peut fournir plus de 200 mg de vitamine C (Schagen et al., 2012).

Le tableau ci-dessous présente les aliments ayant une teneur importante en acide ascorbique (vitamine C) :

Tableau 3 : Les 20 meilleures sources naturelles de la vitamine C (Desaulniers et Dubost, 2007) :

Aliments	Portions	(mg)
Goyave	125 ml (½ tasse)	199
Poivron rouge, cru ou cuit	125 ml (½ tasse)	101-166
Poivron vert, cru ou cuit	125 ml (½ tasse)	54-132
Papaye	½ papaye (153 g)	94
Kiwi	1 fruit moyen (76 g)	71
Orange	1 fruit moyen	70
Jus d'orange	125 ml (½ tasse)	43-66
Mangue	1 fruit moyen (207 g)	57
Brocoli, cru ou cuit	125 ml (½ tasse)	42-54
Choux de Bruxelles cuits	4 choux (84 g)	52
Fraises	125 ml (½ tasse)	52
Jus de pamplemousse rose ou blanc	125 ml (½ tasse)	36-50
Chou-rave cuit	125 ml (½ tasse)	47
Pamplemousse rose ou blanc	½ pamplemousse	42
Jus de légumes	125 ml (½ tasse)	35
Ananas	125 ml (½ tasse)	34
Cantaloup	125 ml (½ tasse)	31
Carambole	1 fruit moyen (88,9 g)	31
Pois verts crus	125ml (½ tasse)	31
Chou-fleur cuit	125ml (½ tasse)	29

1.1.5. Métabolisme

La vitamine C est hydrosoluble, il est bien absorbé dans l'appareil gastro-intestinal et absorbé par le petit intestin à l'intermédiaire d'un mécanisme de transport actif. Le transport cellulaire de la vitamine C est possible par des transporteurs sodium-dépendant de la vitamine C (Sodium-Dependent Vitamin C Transporters ; SVCT1 et SVCT2) (Tsukaguchi et al., 1999). L'acide ascorbique est largement distribué dans tous les tissus du corps, avec des niveaux plus élevés remarquables dans les glandes surrénales et la rétine, et des niveaux faibles dans les reins et les muscles.

Dans le plasma, la vitamine C se trouve soit sous forme libre ou bien liée à l'albumine. La concentration de l'acide ascorbique est basse (5-15 mg/l) dans le plasma et les globules rouges mais elle est très élevée dans les plaquettes et les globules blancs (80 fois supérieur).

La vitamine C est réabsorbée à plus de 90% au niveau tubulaire rénal après filtration glomérulaire (Liang et al., 2001). Elle est métabolisée dans le foie et les reins, avec une série de réactions. Les formes non métabolisés de la vitamine C, comme l'oxalate est en grande partie excrété dans l'urine, l'élimination urinaire se fait sous forme native ou sous formes des métabolites (Li and Zamble, 2009).

1.1.6. Rôles biologiques

L'activité antioxydante, au sens large, est considérée comme responsable des propriétés « préventives » de l'acide ascorbique.

En fait, l'acide ascorbique intervient dans de nombreuses réactions biochimiques, formant ainsi un couple redox « acide ascorbique/acide déhydro-ascorbique » qui semble être à la base des activités physiologiques de la vitamine C :

- ✓ Elle joue un rôle important dans le maintien d'un collagène mature et normal, en empêchant l'auto-inactivation de lysyl et de prolyl hydroxylase, considéré comme enzymes clés de la biosynthèse de ce dernier (Saokar Telang, 2013 ; Boyera et al., 1998) ;
- ✓ Elle est essentielle pour stimuler le système immunitaire de l'organisme, grâce à ses rôles immunostimulant, anti-inflammatoire, antiviral et antibactérien. En raison de ses

effets, elle est approprié pour une utilisation dans divers domaines de la médecine, y compris l'immunologie, la toxicologie, la radiobiologie... ;

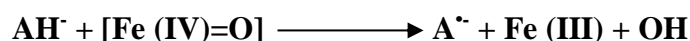
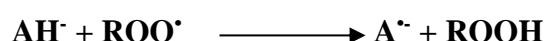
- ✓ Elle est utile pour prévenir une crise cardiaque ou un arrêt vasculaire cérébral. Elle n'abaisse pas le taux de cholestérol et ne réduit pas le risque global de crise cardiaque, mais la preuve suggère qu'elle peut aider à protéger les artères contre les dommages ;
- ✓ Elle est capable de prévenir le cancer à un certain nombre de sites y compris le cancer de la peau, la dysplasie cervicale de l'estomac, des poumons, du côlon, de la prostate et du sein. En outre ces mécanismes comprennent l'amélioration du système immunitaire, l'inhibition de l'hyaluronidase pour prévenir les métastases, et enfin l'amélioration des effets de certains médicaments de chimiothérapie en réduisant la toxicité (Head, 1998) ;
- ✓ Elle a été utilisée dans la prise en charge de l'infertilité masculine sur des bases empiriques, en particulier en présence d'infections séminales non spécifiques. La supplémentation en vitamine C chez l'homme peut améliorer la qualité du sperme et augmente également les taux de progestérone chez les femmes infertiles présentant un défaut de phase lutéale (Chambial et al., 2013).

1.1.6.1. Rôle antioxydant

Le rôle antioxydant de l'acide ascorbique découle de ses propriétés réductrices. C'est l'un des cinq antioxydants de l'alimentation avec la vitamine E, le β -carotène, le sélénium et le zinc.

L'acide ascorbique est un composé antioxydant hydrosoluble, assurant la protection des milieux intra- et extra-cellulaires. Il permet la dégradation des radicaux libres et est capable de piéger les EROs, tels que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les espèces réactives dérivées de l'azote (ERN) (Frei et al., 1998).

De façon indirecte, il agit également en tant qu'antioxydant en régénérant d'autres antioxydants tels que le glutathion et la vitamine E (Kaliora, 2006). Il limite également la peroxydation lipidique en réagissant directement avec les radicaux peroxyde et les complexes oxoferryles (Ball, 2004) :



Ainsi, l'acide ascorbique empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (Ball, 2004 ; Iqbal et al., 2004).

1.1.6.2. L'acide ascorbique : une action pro-oxydante ?

Tandis que les propriétés antioxydantes de l'acide ascorbique corroborent l'hypothèse d'un rôle positif dans la nutrition humaine et la prévention de maladies, certains auteurs invoquent l'activité prooxydante de ce composé *in vitro* :

L'effet antioxydant de la vitamine C implique son oxydation en DHA et la régénération de l'ascorbate à partir de sa forme oxydée pourrait conduire à la formation d'espèces radicalaires, qui à leur tour pourraient être responsables d'effets génotoxiques, *in vitro* (Ballin et al., 1988).

Ainsi, les électrons de l'ascorbate peuvent réduire les métaux tels que le cuivre et le fer, conduisant à la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, et à la génération ultérieure d'espèces oxydantes réactives. Donc, en présence de métaux de transition, l'acide ascorbique est susceptible de se comporter comme pro-oxydant (Carr et Frei, 1999).

En outre, dans certaines circonstances, l'ascorbate, par son action réductrice, générera des oxydants. Ceci est visible *in vivo* lorsque les concentrations pharmacologiques d'ascorbate, en μmol , sont atteintes dans le plasma et dans les liquides extracellulaires, ou également en cas de concentration physiologique d'ascorbate dans les milieux de culture cellulaire en présence de métaux (Parrow et al., 2013). Cependant, la pertinence de cette information dans des conditions physiologiques normales *in vivo* a été remise en question, car la plupart des métaux de transition existent sous une forme inactive liée à la protéine *in vivo* (Halliwell et Gutteridge, 1986).

En revanche, utilisé à des concentrations pharmacologiques (0,3 à 20 mmol/l), l'acide ascorbique présenterait une activité pro-oxydante indépendante du métal de transition, qui serait plus importante dans les cellules cancéreuses et provoquerait la mort cellulaire (Chen et al., 2005).

1.1.7. Carence en vitamine C

La vitamine C joue un rôle important dans de nombreux tissus et une carence de cette dernière entraîne « le scorbut » qui est accompagné par une inflammation, saignement des gencives, des blessures qui ne se cicatrisent pas, et une faiblesse généralisée.

Le traitement consiste à administrer 1g de vitamine C par jour pendant 15 jours. L'appauvrissement en vitamine C (taux d'acide ascorbique sérique entre 2 et 5 mg/l) peut entraîner des complications à long terme telles que l'augmentation des risques cardiovasculaires et néoplasiques ou la cataracte. La nouvelle dose diététique recommandée de vitamine C est de 110 mg par jour pour un adulte (Fain, 2004).

Aujourd'hui sont rares les carences dans les pays développés mais peuvent encore se produire chez les personnes ayant une variété alimentaire limitée.

1.1.8. Toxicité de la vitamine C

La toxicité de la vitamine C est très faible et sans danger, car la molécule étant hydrosoluble, elle est spontanément éliminée lors d'excès éventuels par l'urine.

Aucune étude n'a révélé que l'acide ascorbique est cancérigène ou tératogène ou qu'il cause des effets indésirables sur la reproduction. Les apports élevés en vitamine C ont été signalés comme ayant une faible toxicité. Des effets indésirables ont été rapportés principalement après de très fortes doses (supérieures à 3 g/jour).

Les effets indésirables associés à une consommation très élevée sont la diarrhée et d'autres troubles gastro-intestinaux, l'augmentation de l'excrétion d'oxalate et la formation de calculs rénaux, l'excrétion d'acide urique, les effets pro-oxydants, le conditionnement systémique (rebond scorbut) entraînant une surcharge en fer, une réduction de la vitamine B12 et du cuivre, une augmentation de la demande en oxygène et une érosion de l'émail dentaire.

Dans une étude assez récente, la production de calculs d'oxalate de calcium chez les patients atteints de problèmes rénaux est le plus remarquable d'effet indésirable de la consommation élevée en vitamine C. Aussi une préoccupation supplémentaire concerne une surproduction de fer. Bien que cela soit un effet bénéfique dans la plupart des cas, mais il existe un potentiel de surcharge chez certains individus atteints de maladies telles que l'hémochromatose, l'anémie, la bêta-thalassémie (Martirosyan, 2015).

L'OMS estime que 1g d'acide ascorbique semble être la limite supérieure recommandée de l'apport alimentaire.

CHAPITRE III.
MÉTHODES DE DOSAGE DES
BIOMARQUEURS ET DISCUSSION
D'ÉTUDES

I. Méthodes de dosage des biomarqueurs du stress oxydatif

1. Le choix des biomarqueurs du stress oxydant

Les scientifiques se sont intéressés, dès le début, des recherches sur le stress oxydant, à la découverte d'un marqueur biologique qui identifierait à coup sûr la présence d'un stress oxydant dans diverses situations expérimentales ou cliniques.

Toutes les méthodes proposées, qu'elles que soient, présentent toujours leurs propres spécificités et limites, montrant qu'il serait utopique de croire en l'existence d'un marqueur idéal et unique de stress oxydant (Favier, 1997 ; Pincemail et al., 1999). Donc, les critères d'un bon biomarqueur peuvent être définis comme suit (Carine Badouard, 2006) :

- ✓ Un produit majeur de modification oxydative qui peut être directement impliqué dans le développement de la maladie ;
- ✓ Un produit stable non susceptible d'induction artéfactuelle ou de perte durant la conservation des échantillons ;
- ✓ Représentatif de la balance entre la génération des dommages oxydatifs et leur élimination ;
- ✓ Déterminé par une analyse spécifique, sensible, reproductible et robuste ;
- ✓ Libre des facteurs confondants venant d'une prise alimentaire ;
- ✓ Accessible dans un tissu cible comme les lymphocytes et cellules mononuclées ;
- ✓ Mesurable dans les limites de détection d'une procédure analytique fiable.

Ainsi,

- ✓ Les dosages des biomarqueurs en fonction du matériel dont nous disposons au sein de notre établissement et les réactifs disponibles.

Selon ces critères, nous allons nous intéresser dans ce chapitre aux méthodes employées pour déterminer les principaux paramètres du stress oxydatif:

2. Méthodes de dosage des principaux biomarqueurs du stress oxydatif

2.1. Dosage du glutathion réduit (GSH)

La méthode de Wekbeker et Cory (1988) a été appliquée pour le dosage du glutathion dans les tissus. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercapturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela, une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

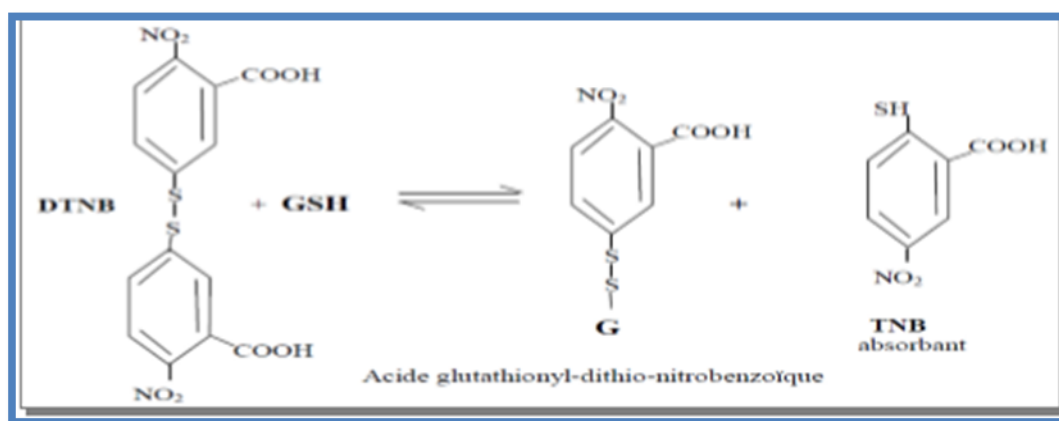


Figure 25 : Principe de dosage du glutathion

Pour l'homogénat, une préparation obtenue après broyage et homogénéisation des tissus dans le TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4), la suspension est centrifugée à 9000 tours par minute pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors récupéré pour le dosage.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante:

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique (0.25%).

Après agitation durant 15 mn dans un bain de glace:

- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant. Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH 9.6. Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.

Après 5 min d'incubation, la lecture de l'absorbance s'effectue à $\lambda = 412$. La concentration en glutathion (GSH) est évaluée selon la formule :

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéine}}$$

- DO : Densité optique ;
- 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation ;
- 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant ;
- 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm ;
- 0.8 : Volume de l'homogénat ;
- 0.5 : Volume du surnageant.

La concentration de la forme réduite du glutathion (GSH) est mesurée par apport à 1mg de protéines. Ce dosage doit donc être accompagné par le dosage des protéines.

2.1.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie et l'albumine de bœuf comme standard.

Le bleu de Coomassie réagit avec les groupements amines (-NH₂) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines dans l'échantillon.

Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat ;
- ✓ Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie ;
- ✓ Agiter et laisser reposer 5 minutes ;
- ✓ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc.

La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée. La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA à 1 mg/ml), réalisée dans les mêmes conditions (fig.24) :

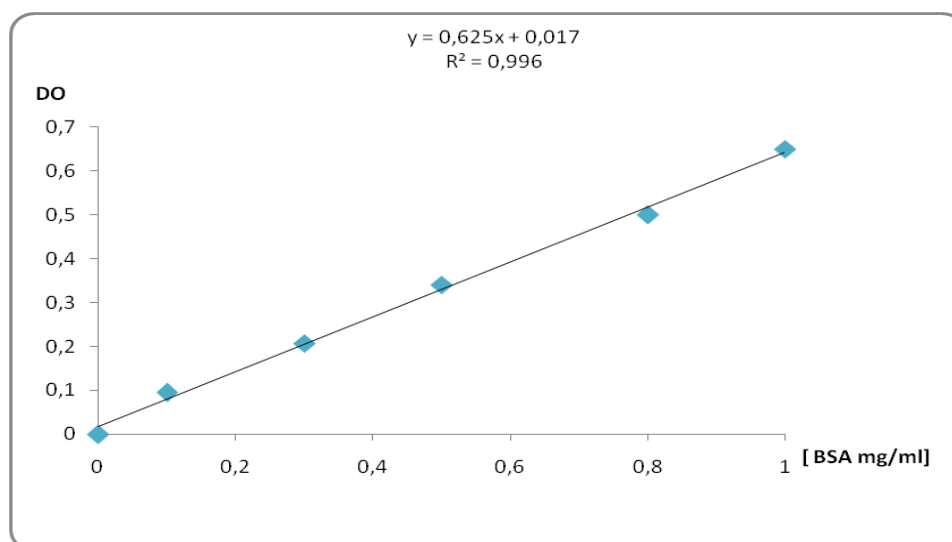


Figure 26 : la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines.

2.2. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiées par les radicaux libres.

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La réaction de dosage du malondialdéhyde, décrite par Esterbauer et al en 1992, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique, d'un pigment absorbant à 530 nm.

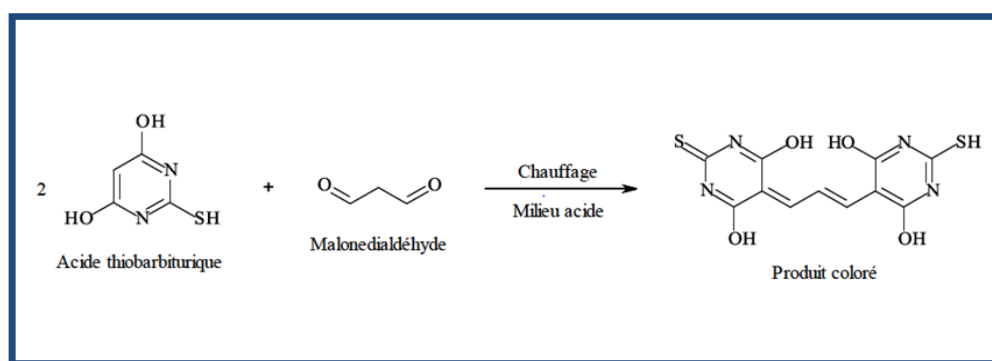


Figure 27 : Principe de dosage du malondialdéhyde

La procédure s'est déroulée de la façon suivante :

- ✓ Prélever 375 µl de l'homogénat (surnageant) ;

- ✓ Ajouter 150 µl de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4) ;
- ✓ Ajouter 375 µl de la solution TCA-BHT (TCA 20%, BHT 1%) ;
- ✓ Vortexer et Centrifuger à 1000 tours/min pendant 10 min ;
- ✓ Prélever 400 µl du surnageant. Ajouter 80 µl du HCl 0.6 M ;
- ✓ Ajouter 320 µl de la solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120 mM) ;
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 80 °C pendant 10 minutes.

La lecture se fait par spectrophotométrie, l'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de MDA formé, donnant ainsi une évaluation précise des lipides peroxydés.

La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($DO = E.C.L$) :

$$C \text{ (nmol/mg protéine)} = \frac{DO \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

- C : Concentration en nmoles/mg de protéines ;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- E : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm ;
- X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution : Fd = 0.2083.

2.3. Dosage de l'activité de la GPx

Le dosage de l'activité de la GPx tissulaire a été réalisé selon la méthode décrite par Flohe et Gunzler (1984), fondée sur l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) par la GPx parallèlement à la réduction de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau :



Ce dosage a été fait selon les étapes suivantes :

- ✓ Prélever 0.2 ml de l'homogénat (surnageant);

- ✓ Ajouter 0.4 ml de GSH (0.1 mM);
- ✓ Ajouter 0.2 ml de la solution tampon TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7.4);
- ✓ Incuber au bain Marie à 25 °C, pendant 5 min;
- ✓ Ajouter 0.2 ml de H₂O₂ (1.3 mM) pour initier la réaction, laisser agir pendant 10 minutes;
- ✓ Ajouter 1 ml de TCA (1%) pour arrêter la réaction.

Après incubation pendant 30 minutes dans la glace:

- ✓ Centrifuger durant 10 minutes à 3000 tours /minutes;
- ✓ Prélever 0.48 ml du surnageant. Ajouter 2.2 ml de la solution tampon TBS;
- ✓ Ajouter 0.32 ml de DTNB (1.0 mM), puis mélanger l'ensemble.

Après 5 minutes, l'activité de la GPx a ensuite été déterminée par spectrophotométrie à 412 nm selon la formule :

$$\text{GPx (nmol GSH/mg)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} \times \text{DO}_{\text{étalon}} \times 0.04}{\text{DO}_{\text{étalon}}}$$

- DO_{échantillon} : Densité optique de l'échantillon ;
- DO_{étalon} : Densité optique de l'étalon ;
- 0.04 : Concentration de substrat (GSH).

2.4. Dosage de la catalase (CAT)

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus. Ce sont des enzymes tétramériques, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Ces enzymes interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydant en éliminant les espèces réactives et en accélérant la réaction spontanée de l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) toxique pour la cellule en eau et en oxygène (Aebi, 1984).

La réaction se fait en deux étapes. La réaction bilan est :



L'activité de la CAT est mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible par la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

2.4.1. Mode opératoire

Réactifs	Blanc (ul)	Essai (ul)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	800	780
H ₂ O ₂ (0.5 M)	200	200
Homogénat	-	20

On note que :

- ✓ Le zéro de l'appareil est réalisé par le tampon phosphate ;
- ✓ La quantité du surnageant (S9) doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui doit être comprise entre 1 et 1,5 mg/mL, soit une quantité de 10 à 20 µL de S9 dilué ;
- ✓ L'activité décroît rapidement, il est important de mettre toujours le même temps de pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre ;
- ✓ La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

2.4.2. Calcul de l'activité de CAT :

$$\text{L'activité de la CAT (uM H}_2\text{O}_2\text{/min/mg protéines (50 mg/dl))} = \frac{\Delta\text{DO} \times 10}{\varepsilon \times L \times X \times Fd}$$

- ΔDO : Variation de la densité optique par minutes ;
- ε : Coefficient d'extinction du H₂O₂ (0,04 mM⁻¹.Cm⁻¹) ;
- L : Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm) ;
- X : Quantité des protéines en mg/ml ;
- Fd : Facteur de dilution du H₂O₂ dans le tampon (0,02).

II. Discussion

Comme nous l'avons déjà mentionné, le stress oxydant peut causer de sévères dommages cellulaires. Pour se protéger de ce type d'agression, notre organisme produit ou fait appel à une source exogène d'antioxydants. L'utilité de certains nutriments semble aujourd'hui reconnue. Il s'agit, en particulier de vitamines ayant une activité antioxydante, permettant de lutter contre les radicaux libres.

Dans cette partie de notre travail, nous présenterons à travers des exemples des études, les résultats portant sur le lien entre la consommation de la vitamine C et le risque engendré par certains agents pro-oxydants.

Plusieurs études ont utilisé des modèles animaux afin de déterminer les effets toxiques des agents environnementaux pro-oxydants (pesticides, métaux lourds, médicaments) et d'étudier le pouvoir antioxydant de la vitamine C (Sunil Kumar et al., 2017 ; Sema et al., 2013 ; Nisar Ahmad et al., 2013 ; Savran et al., 2017 ; El-Shitany et El-Desoky, 2016).

L'étude de (Sunil Kumar et al., 2017), a pour objet d'évaluer la toxicité hépatique du carbofuran, un insecticide de la famille des carbamates chez les rats mâles albinos. Au travers de cette étude, les auteurs ont montré que l'exposition à des différentes doses du carbofuran, a provoqué une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation du taux de MDA), indiquant que les effets délétères du carbofuran chez les rats sont associés à un stress oxydant au niveau du foie.

Ce résultat a permis aux auteurs de suggérer que cet insecticide agit au niveau du foie via des phénomènes oxydatifs liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène, conduisant à la libération de différents aldéhydes toxiques comme le malondialdéhyde (MDA), qui représente un bio marqueur de la peroxydation lipidique.

Ainsi, le pouvoir pro-oxydant du carbofuran, a été également confirmé par des modifications dans l'activité de l'enzyme antioxydante la superoxyde dismutase (SOD), qui est souvent considérée comme le marqueur le plus significatif du stress oxydant cellulaire, chez les rats contaminés par le carbofuran.

Toutefois, ces mêmes auteurs ont montré le pouvoir protecteur de la vitamine C contre la toxicité hépatique induite par le carbofuran. Grâce à ses propriétés antioxydantes, le

traitement des rats par la vitamine C a empêché l'augmentation des niveaux de MDA et a amélioré significativement le taux de la SOD dans le foie.

Une autre étude utilisant les érythrocytes humains comme modèle expérimental, confirme également l'effet prooxydant des pesticides. Les paramètres du stress oxydant pris en considération sont : l'MDA, l'activité enzymatique de superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et du catalase (CAT). En effet, l'étude de Sema et ses collaborateurs en 2013, a montré que le traitement des érythrocytes par le dichlorvos (un acaricide utilisé pour la conservation de céréales), a entraîné une augmentation du taux de MDA et une réduction des défenses antioxydantes enzymatiques (SOD, GPx et CAT).

Le taux élevé du malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire, est le reflet de la présence de lipides ayant subi une peroxydation par les EROs générées par le dichlorvos. De plus, la baisse de l'activité des enzymes antioxydantes dans les érythrocytes humains, est considérée comme un mécanisme préventif à l'action de dichlorvos. La (SOD, GPx et CAT) sont considérées comme des enzymes jouant un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs occasionnés par les EROs.

En traitement préventif, la vitamine C et E ont, par ailleurs, empêché l'augmentation des niveaux de MDA. De même, le traitement a amélioré significativement le taux de (SOD, GPx et CAT) dans les érythrocytes humains. Ces résultats montrent clairement que la vitamine C et E ont permis de rétablir les perturbations pro-oxydantes induites par le dichlorvos. Cet effet serait en partie dû à leurs propriétés antioxydantes.

Une autre étude (Nisar Ahmad et al., 2013) du même type a montré qu'un traitement des rats par le chlorpyrifos (l'un des insecticides les plus utilisés au monde) et/ou l'acétate de plomb (un composé chimique utilisé comme réactif pour former d'autres composés du plomb ou comme fixateur dans certaines teintures), provoque un dommage oxydatifs au niveau du sang. Le chlorpyrifos et l'acétate de plomb dissous dans l'eau potable sont administré aux rats par voie orale.

En effet, à la suite d'un traitement au chlorpyrifod et/ou l'acétate de plomb, une augmentation du taux de MDA, une déplétion de la teneur en GSH réduit et une diminution de la concentration plasmatique en (SOD, GPx, CAT et GST), ont été observés chez les rats après 98 jours de traitement.

Dans cette même étude, Nisar Ahmad et al montrent également une présence d'effet bénéfique de la vitamine C sur la toxicité de chlorpyrifod et l'acétate de plomb. Le traitement a amélioré significativement le taux de MDA, GSH, SOD, GPx, CAT et GST dans le sang.

En dehors des facteurs pro-oxydants classiques, certains médicaments peuvent être également responsables d'un stress oxydatif plus ou moins important. En fait, une récente étude publiée dans le journal (*Physiology International, Acta Physiologica Hungarica*), dirigée par Savran et al en 2017 a constaté que le méthotrexate (un médicament utilisé dans le traitement de certains cancers et dans les maladies auto-immunes), administrées par voie intra-péritonéale, sont à l'origine d'un stress oxydant chez des rats mâles de la souche Wistar.

Au travers de cette étude, Savran et al ont montré que le traitement des rats par ce médicament a provoqué une augmentation de la peroxydation lipidique hépatique et rénale, indiquant que les effets délétères du méthotrexate chez les rats sont associés à un stress oxydant au niveau des organes. Dans ce même groupe des rats, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et CAT), ont été également signalé par Savran et al. Toutefois, ces mêmes auteurs ont montré le pouvoir protecteur de la vitamine C contre la toxicité rénale et hépatique induite par le méthotrexate.

D'autres chercheurs ont également rapporté l'effet pro-oxydant des médicaments. El-Shitany et El-Desoky en 2016, ont par exemple montré l'effet pro-oxydant de l'azithromycine : un médicament antibiotique connu pour perturber le rythme cardiaque. Selon cette étude, l'azithromycine génère chez les rats des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont associées à un risque accru d'arythmie cardiaque.

L'effet pro-oxydant de ce médicament est confirmé par El-Shitany et El-Desoky suite à une augmentation de la peroxydation lipidique dans le muscle myocardique des rats traités par l'azithromycine. Une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx et SOD) et une déplétion de la teneur tissulaire en GSH réduit, ont été observées chez les rats traités par l'azithromycine

Afin de confirmer l'effet santé des antioxydants, El-Shitany et El-Desoky ont montré le pouvoir protecteur de la vitamine C contre l'insuffisance cardiaque induite par l'azithromycine. La supplémentation avec la vitamine C a été associée à une réduction du risque d'arythmie cardiaque due à la capacité de la vitamine C de piéger les radicaux libres et d'améliorer le système de défense antioxydant de l'organisme.

Enfin, ces données expérimentales montrent dans leur ensemble que la vitamine C était capable de protéger les structures cellulaires des altérations oxydatives et stimulait l'activité des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques face au stress oxydant induit par les agents pro-oxydant.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Le stress oxydatif ou stress oxydant correspond à une agression des cellules par des radicaux libres, aussi appelés « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Ces dernières, sont produites dans les organismes vivants sous l'effet du métabolisme cellulaire normal ou de facteurs environnementaux comme le tabac ou la pollution. Ainsi, plusieurs études épidémiologiques et cliniques suggèrent que le stress oxydant joue un rôle important dans la genèse et l'entretien de nombreuses pathologies humaines (diabète, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer,...) ainsi que le vieillissement. Cependant, les antioxydants apportés par une alimentation saine, particulièrement riche en fruits et légumes, permettent de protéger notre organisme contre les radicaux libres et la prévention de nombreuses maladies. A ce titre, l'utilisation de suppléments d'antioxydants comme la vitamine C pour prévenir les situations de stress oxydant a été particulièrement étudiée.

À la suite d'une étude bibliographique sur le phénomène du stress oxydant, notre recherche apporte un éclairage sur les études faites précédemment, montrant qu'une exposition à des agents pro oxydants pouvant provoquer des effets néfastes sur l'organisme. Ainsi, les résultats de ces études ont permis d'affirmer que la vitamine C pourrait s'avérer bénéfiques pour la santé. Cette recherche documentaire que nous avons menée nous a permis également d'identifier plusieurs perspectives :

1) intensifier les recherches sur les sources de stress oxydant qui sont l'un des éléments essentiels pour répondre à des questions relatives à la compréhension de ces mécanismes délétères ;

2) étudier les effets toxiques des divers agents prooxydants (e.g métaux lourds et pesticides) chez le rat ou d'autres espèces de mammifères, par le dosage de marqueur enzymatique (GPx, SOD, CAT) ou non enzymatique (GSH, MDA) ;

3) déterminer les effets d'une exposition (court et long termes) à des agents prooxydants, afin de mettre en évidence des relations dose-effet et les éventuels risques potentiels pour la santé de l'homme et de l'animal ;

4) confirmer les actions préventives des nutriments et micronutriments antioxydants comme les vitamines (C, E, A,...) et les possibilités de renforcer l'effet protecteur de l'organisme par la supplémentation de ces composés naturels.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Tawab H.M., Tarek M.H., Belaiba M., Raelison E.G., Ferhout H., Bouajila J.** (2015). Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrelopsis grevei* on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **15**: 251.
- Acharya A., Das I., Chandhok D., Saha T.** (2010). Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**: 23-34.
- Aebi H.** (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121-126.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A.** (2007). Reactive oxygen species and superoxide Dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*. **74**: 636-643.
- Albano E., French S., Ingelmann-Sundberg M.** (1999). Hydroxethyl radicals in ethanol Hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience*. **4**: 533-540.
- Albano E., Tomasi A., Ingelmann-Sundberg M.** (1994). Spin trapping of alcohol-derived radicals in microsomes and reconstituted systems by electron spin resonance. *Meth Enzymo.* **233**: 117-127.
- Alcaraz M.J., Gualillo O., Sánchez-Pernaute O.** (2013). *Studies on Arthritis and Joint Disorders*. Springer New York.
- Alfadda A.A., Sallam R.M.** (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.*
- Amandine G.** (2016). *Plantes médicinales et antioxydants*. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III Paul Sabatier, Faculté Des Sciences Pharmaceutiques. p : 102.
- Amarouche A., Abid A.** (2016). Nanotoxicité de Fe₃O₄ (NPs) sur les paramètres du stress oxydatif d'un modèle cellulaire alternatif *Paramecium* sp. Mémoire De Master de l'Université de Larbi Tébessi –Tébessa, Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie. p : 125.
- Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P.** (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer. A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**: 6858-6862.
- Andrew Karplus P., Georg E. Schulz.** (1989). Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: Substrate crystal structures at 2Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, vol. 210: 1...180-63.
- Anvari E., Wikström P., Walum E., Welsh N.** (2015 Nov). The novel NADPH oxidase 4 inhibitor GLX351322 counteracts glucose intolerance in high-fat diet-treated C57BL/6 mice. *Free Radic Res.* **49** (11):1308-18.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aprioku J.S.** (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil.* **14** (4): 158-172.
- Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**:483-495.
- Banerjee M., Vats P.** (2013). Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biol.* **2**:170-7.
- Barja G.** (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr.* **31**: 347-66.
- Baynes J.W., Thorpe S.R.** (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48** (1): 1-9.
- Benavente-Garcia O., Castillo J.** (2008). Update on uses and properties of *citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* **56** (15): 6185-6205.
- Bennamara F.Z.** (2017). Stress oxydant Et pathologies humaines. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V-Rabat, Faculté De Médecine Et De Pharmacie-Rabat. p: 172.
- Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M.** (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* **65**:1865-1874.
- Bisbal C., Lambert K., Avignon A.** (2010). Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **13** (4) : 439-46.
- Bonnefont-Rousselot D.** (2014). Obésité et stress oxydant. *Obésité.* **9** : 8-13.
- Bonnefont-Rousselot D., Thérond P., Beaudeau J.L., Peynet J., Legrand A., Delattre J.** (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann. Biologica et Clinica.* **59** : 453-459.
- Boubekri C.** (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat de l'Université Mohamed Khider – Biskra.
- Brigelius-Flohe R., Traber M.G.** (1999). Vitamin E: function and metabolism. *Faseb j.* **13** (10): 1145-1155.
- Brownlee M.** (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* **414** (6865) : 813-820.
- Bruneval P.** (2003). Structure de la paroi artérielle normale : notions pratiques. *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques.*, J.F., Toussaint M.P., Jacob L., Lagrost J. Chapman, Eds. Masson: Paris. **1**: 5-11.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Burton G., Jauniaux E.** (2011). Oxidative stress. Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology. **25**: 287-299.
- Camille M., Mireille S.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Med Sci (Paris). **27** (4) : 405-412.
- Cantin P.A.** (1999). Oxidant and antioxidants in lung injury. In: Lam and Other Diseases Characterized By Smooth Muscle Proliferation. Moss J (Ed) New York, USA. 519-531.
- Carine B.** (2006). Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de doctorat de l'Université Joseph-Fourier - Grenoble I, France. p : 51.
- Carr A., Frei B.** (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? The FASEB Journal. **13** (9): 1007-1024.
- Chalouhi N., Ali M.S., Starke M.R., Jabbour P.M., Tjoumakaris S.I., Gonzalez L.F., Rosenwasser R.H., Koch W.J., Dumont A.S.** (2012). Cigarette smoke and inflammation : role in cerebral aneurysm formation and rupture. Mediators of inflammation. 1-12.
- Charbon G., Bjorn L., Mendoza-Chamizo B., Frimodt-Moller J., Lobner-Olesen A.** (2014). Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of Escherichia coli. Nucleic Acids Research. **42** (21): 13228-13241.
- Christen Y.** (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. Am J Clin Nutr. **71** (2):621S - 629S.
- Clarkson P.M., Thompson H.S.** (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? Am. J. Clin. Nutr. **72** (2): 637-646.
- Comhair S.A.A., Erzurum S.C.** (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **283** (2): 246-55.
- Cotticelli M.G., Crabbe A.M., Wilson R.B., Shchepinov M.S.** (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. Redox Biology. **1** : 398-404.
- Curtay J.P., Robin J.M.** (2000). Intérêt des complexes antioxydants. Nutrithérapie Info.
- Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A.** (2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen, Signalling. **14**: 879.
- Das K., Roychoudhury A.** (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants/Front.
- Davies K.J.** (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. Iubmb Life. **50**: 279-289.
- De Jaeger C.** (2011). Les théories du vieillissement. Médecine & Longévité. **3** : 155-174.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D.** (2005). Radicaux libres et stress oxydant : Aspects biologiques et pathologiques (broché). L'actualité Chimique. 108-115.
- Derubertis F.R., Craven P.A.** (1994). Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. **43** (1):1-8.
- Desmier T.** (2016). Les antioxydants de nos jours : définition et applications. Thèse de doctorat de l'Université de Limoges Faculté de Pharmacie. p : 88.
- Desport J.D.** (2002). Nutrition et stress oxydant. Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutr Clin Métabol*. 253-25.
- Dröge W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. **82** (1) : 47-95.
- Dwassy A.** (2014). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Thèse de doctorat de l'Université Mohammed V-souissi, Faculté de médecine et de pharmacie - Rabat. p : 171.
- El-Shitany N.A., El-Desoky k.** (2016). Protective Effects of Carvedilol and Vitamin C against Azithromycin-Induced Cardiotoxicity in Rats via Decreasing ROS, IL1- β , and TNF- α Production and Inhibiting NF- κ B and Caspase-3 Expression. Hindawi Publishing Corporation.
- Enoiu M.** (2001). Rôle pro-oxydant de la gamma-glutamyltransférase et de la gammaglutamyltransférase « related » dans la peroxydation lipidique. Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy.
- Ernster L., Forsmark-Andree P.** (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig*. **71**: 60-65.
- Eum W.S., Choi S.Y.** (2009). Transduced human PEP-1-catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic Biol Med*. **47** (7): 941-952.
- Fabre G., Bayach I., Berka K., Paloncýová M., Starok M., Rossi C., et al.** (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chem Commun*. **51** (36):7713-6.
- Fam S.S., Morrow J.D.** (2003). The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr. Med. Chem*. **10**: 1723-1740.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G.** (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **18**:872-879.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Favier A.** (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*. **55** (1) : 9-16.
- Favier A.** (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. p : 108-115.
- Favier A.** (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Biol Clin*. **64** (6): 390-6.
- Flora S.J.S.** (2009). Aspects chimiques et biologiques des antioxydants pour les stratégies contre l'exposition aux métaux et métalloïdes/*Oxid Med cellulaire Longev*. **2** (4) : 191-206.
- Fontaine E.** (2007). Radicaux libres. In : *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer-Verlag France. p: 251-257.
- Foyer C.H., Trebst A., Noctor G.** (2008). Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In: *photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Springer Science Business Media. p: 241-268.
- Frank M., Faraci., Sean P., Didion.** (2004). Vascular protection superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Thrombosis and vascular biology*. **24**: 1367.
- Frankel E.N.** (2005). *Lipid oxidation*. 2nd Edition, The Oily Press, P.J. Barnes, Bridgwater; xvi + 470 pp. UK ISBN: 0-9531949-8-1.
- Freeman B.A., Crapo J.D.** (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in Rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*. **256**: 10986-10992.
- Fulbert J.C., Cals M.J.** (1992). Les Radicaux libres en biologie clinique. *Pathol. Biol*. **49** (1) : 66-77.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D.** (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*. 91-96.
- Gillery P.** (2006). Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus. *Ann Biol Clin (Paris)*. **64** (4):309-14.
- Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G.** (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med*. **15**: 435-45.
- González R.G.P., Barnett J., Aguayo H.M., Cheng L.T., Chylack J.** (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens, *Diabetes*. **33** : 196 - 199.
- Goto M., Ueda K., Hashimoto T., Fujiwara S., Matsuyama K., Kometani T., Kanazaw K.** (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*. **45**:1318-1325.
- Graham D.G., Tiffany S.M., Bell W.R., Gutknecht W.F.** (1978). Autooxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine,

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

and related compounds towards C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* **14**: 644-53.

Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic Res Commun.* **19** (3): 141-58.

Gulcin I. (2012). "Antioxidant activity of food constituents: an overview." *Arch Toxicol.* **86** (3): 345-391.

Gupta S.C., Hevia D., Patchva S., Park B., Koh W., Aggarwal B.B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal.* **16**: 1295-1322.

Gutteridge, J.M. (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* **91**:133-140.

Haj Mouhamed D., Ezzaher A., Neffati F., Douki W., Gaha L., Najjar M.F. (2012). Etude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs : le malondialdéhyde. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.* **27** : 153-158.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege.* **62** (10): 628-638.

Halliwell B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life/Plant Physiol.* **141** (2): 312-322.

Halliwell B. (1994). Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause or Consequence. *The Lancet.* **344** (8924): 721-724.

Halliwell B. (1996). Uric acid: an example of antioxidant evaluation. In: Cadenas E, Packer L. Editors. *Handbook of antioxidants.* New York: Marcel Dekker. p: 243-256.

Halliwell B., Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 715-725.

Halliwell B., Gutteridge J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* **246**: 501-514.

Halliwell B., Gutteridge J.M. (1988). Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol.* **7**: 7-13.

Halliwell B., Gutteridge J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85).

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth Edition. Oxford University Press.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C.** (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed. Oxford University Press. p: 20-31.
- Harman D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**: 298-300.
- Harrison R.** (2002 Sep). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* **33** (6): 774-97.
- Hwang I., Lee J., Huh J.Y., et al.** (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal Injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes.* **61**: 728-738.
- Hwang O.** (2013). Role of Oxidative Stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.* **22** (1):11-7.
- Jairam V., Uchida K., Narayanaswami V.** (2012). Pathophysiology of lipoprotein oxidation. In *Lipoproteins - Role in Health and Diseases. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, édité par Sasa Frank and Gerhard Kostner, chap.16.
- Jang M., et al.** (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* **275** (5297):218-220.
- Ji L.L., Fu R.** (1992). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* (1985). **72** (2) :549-54.
- Ji L.L., Fu R., Mitchell E.W.** (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle : effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol.* **73** : 1854-1859.
- Kebieche M.** (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de Doctorat de l'Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p : 143.
- Kelloff G.J., et al.** (1994). Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *Journal of Cellular Biochemistry.* **56** (S20):1-24.
- Khalid S. A., Govindasamy C., Chinnadurai V., Mohammed.A.A.** (2015). Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Report.* **20** (5) :198-209.
- Khither H.** (2019). Etude des effets de la thymoquinone sur le stress oxydant : Application à l'hépatotoxicité et l'arthrite rhumatoïde induite chez le rat. Thèse de doctorat de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p : 136.
- Khither H.** (2020). Effect of Thymoquinone as Prophylactic Treatment Against CCl₄-Induced Hepatotoxicity on Antioxidants Status. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics.* **10** (5) : 208-212.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kim D.W., Jeong H.J., Kang H.W., Shin M.J., Sohn E.J., Kim M.J., Ahn E.H., An J.J., Jang S.H., Yoo K.Y., Won M.H., Kang T.C., Hwang I.K., Kwon O.S., Cho S.W., Park J., Eum W.S., Choi S.Y.** (2009). Transduced human PEP-1–catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic Biol Med.* **47** (7): 941-952.
- Kodytková J., Vávrová L., Kocík M., Žák A.** (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha).* **60** (4):153-67.
- Kryston T.B., Georgiev A.B., Pissis P., Georgakilas A.G.** (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* **711** : 193-201.
- Landrier J.F.** (2011). Vitamine E et physiologie du tissu adipeux/nutrition et santé. **18**(2): 83- 87.
- Langsjoen P.H., Langsjoen A.M.** (2003). The clinical use of depletion of coenzyme Q10 .A review of animal and human publications.**18**: 101-111.
- Lau A.T., Wang Y., Chiu J.F.** (2008). Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem.* **104** (2): 657-667.
- Le moal M.I., et al.** (1992). The behavioral neuroendocrinology of arginine vasopressin, adrenocorticotrophic hormone, and opioids. In C.B Nemeroff (Ed.). *Neuroendocrinology.* 365-396.
- Le Pecheur M., Bourdon E., Paly E., Farout L., Friguet B., and London J.** (2005). Oxidized SOD1 alters proteasome activities in vitro and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. *FEBS Lett* 579, 3613-8.
- Lee H., Lee Y.J., Choi H., et al.** (2009). Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem.* **284** : 10601-9.
- Léoni J.** (2001). Physiopathologie de l'athérosclérose- Mécanisme et prévention de l'athérombose. Université de Franche-Comté - UFR de Pharmacie – Besançon, France.
- Leopold J.A., Loscalzo L.** (2009). Oxidative Risk for Atherothrombotic Cardiovascular Disease.*Free Radic Biol Med.* **47**: 1673-1706.
- Leverve X.** (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* **44** (5) : 219-224.
- Li Y., Zamble D.B.** (2009). Nickel homeostasis and nickel regulation : an overview. *Chem Rev.* 109: 4617-4643.
- Lonn M.E., Dennis J.M., Stocker R.** (2012). Actions of ‘antioxidants’ in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine.* **53**: 863-884.
- Lopez G.V., Batthyany C., Blanco F., Botti H., Trostchansky A., Migliaro E., Radi R., Gonzalez M., Cerecetto H., Rubbo H.** (2005). Design, synthesis, and biological

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 5787-5796.

Mahdavinia M., Alizadeh S., Raesi Vanani A., Dehghani M.A., Shirani M., Alipour M., Shahmohammadi H.A. Rafiei Asl S. (2019). Effects of quercetin on bisphenol A-induced mitochondrial toxicity in rat liver. *Iran J Basic Med Sci.* **22**: 499-505.

Maples K.R., Mason R.P. (1988). Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem.* **263**: 1709-1712.

Martin K.A., Hwa J. (2012). Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. *Frontiers in Pharmacology.* **3**.

Mates J.M., Perez-Gomez C., De Castro I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* **32**: 595-603.

Mehta S.K., Joghi S., Gowde T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions.

Mena S., Ortega A., Estrela J.M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research.* **674**: 36-44.

Merksamer P.I., Liu Y., He W., Hirschey M.D., Chen D., Verdin E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging.* **5** (3) : 144-150.

Migdal C., Serres M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences.* **27**: 405-12.

Mirvish S.S. (1986). Effects of vitamins C and E on carcinogen formation and action, and relationship to human cancer. *Basic Life Sciences.* **39**: 83.

Moller I.M., Jensen P.E., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **58**: 459-481.

Monteil C., Mulder P., Thuillez C. (2004). Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique ? *Médecine thérapeutique Cardiologie.* **2**: 75-85.

Nakashima I., et al. (2002). Redox-linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase activation. *Antioxid Redox Signal.* **4** (3): 517-531.

Neuzil J., Stocker R. (1993). Bilirubin attenuate radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett.* **331**: 103-104.

Nikitaki Z., Hellweg C.E., Georgakilas A.G, Ravanat J.L. (2015). Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Front Chem* [Internet].

Nohl H., Gille L., Staniek K. (2005). Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol.* **69** (5): 719-723.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- O'Mahony J.A., Fox P.F., Kelly A.L.** (2013). Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. 4th Edition, Springer Science Business Media New York, p: 337-385.
- Obrenovich M.E., et al.** (2010). The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuvenation research*. **13** (6):6316643.
- Oshima J., Huang S., Pae C., Campisi J., Schiestl R.H.** (2002). Lack of WRN results in extensive deletion at nonhomologous joining ends. *Cancer Res*. **62** : 547-551.
- Packer L., Weber S.U., Rimbach G.** (2001). Molecular aspects of α -tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *Journal of Nutrition*. **31**: 369-373.
- Palmer R.M., Rees D.D., Ashton D.S., Moncada S.** (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. **153** (3): 1251-6.
- Paolisso G., D'Amore A., Galzerano D., Varricchio M., D'Onofrio F.** (1993). Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type 1-2 diabetic patients. *Diabetes Care*. **16**: 1433 - 1437.
- Paravicini T.M., Touyz R.M.** (2008 Feb). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. **31** (2) : 170-80.
- Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L.** (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / *Indian J Clin Biochem*. **30** (1): 11-26.
- Piechota-Polanczyk A., Fichna J.** (2014). The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases / *Pharmacol J. Naunyn-Schmiedeberg*. **387** (7) : 605-620.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O.** (2000). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16** : 233-239.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O.** (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*. **4** (5).
- Powers S.K., Jackson M.J.** (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*. **88** (4): 1243-1276.
- Powers S.K., Lennon S.L.** (1999). Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *The Nutrition Society*. **58**: 1025-1033.
- Prasad S., Yadav V.R., Ravindran J., Aggarwal B.B.** (2012). ROS and CHOP are critical for dibenzylideneacetone to sensitize tumor cells to TRAIL through induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. *Cancer Res*. **71**: 538-549.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Quan F., Korneluk R.G., Tropak M.B., Gravel R.A.** (1986). Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res.* **14** (13): 5321-35.
- Qutub A.A., Popel A.S.** (2008). Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1 α differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol.* **28** (16): 5106-19.
- Raman V., Arjun V., Marla J.B.** (2011). Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates. Molecular Aspects of Cell Signaling.* P: 195-208.
- Ramasamy R., Yan S.F., Schmidt A.M.** (2006). Glycation and RAGE: Common Links in the pathogenesis of Microvascular and Macrovascular Complications of diabetes. *Canadian Journal of Diabetes.* **30**: 422-429.
- Rapoport R., Sklan D., Hanukoglu I.** (1995). Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial p450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys.* **317**: 412-416.
- Roberfroid M.B.** (2008). *L'aliment fonctionnel 2^{ème} édition.* Edition TEC et DOC. Lavoisier. pp : 211-212.
- Rochette L.** (2008). Stress oxydant et sepsis. *Réanimation.* **17**(6): 1-4.
- Ruas C.B., Carvalho Cdos S., De Araujo H.S., Espindola E.L., Fernandes M.N.** (2008). Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf.* **71**: 86-93.
- Sadikovic B., Al-Romaih K., Squire J.A, Zielenska M.** (2008). Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer, *Curr. Genomics.* **9**: 394-408.
- Sargazi Z., Nikravesh M.R., Jalali M., Sadeghnia H.R., Anbarkeh F.R., Mohammadzadeh L.** (2014). Diazinon-Induced Ovarian Toxicity and Protection by Vitamins E. *Iranian Journal of Toxicology.* **8**: 1130-1135.
- Schapira A., Gu H., Taanman M., Tabrizi J.W., Seaton S. J., Cleeter T., Cooper M.J.M.** (1998). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* **44**: S89-98.
- Schiavone S., Jaquet V., Trabace L., Krause K.H.** (2013). Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology /Antioxid Redox Signal. **18** (12): 1475-1490.
- Schisler N.J., Singh S.M.** (1989). Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.* **7**: 117-123.
- Selby C., Drost E., Wraith P., Macnee W.** (1991). Neutrophil Traffic Through the Lungs in Man. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **624** (1): 353-354.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Selvaraj N., Bobby Z., Sathiyapriya V.** (2006). Effect of lipid peroxides and antioxydants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **366**: 190-195.
- Servais S.** (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon 1, France. p : 19-35.
- Sharma A., Kharb S., Chungh S.N., Kakkar R., Singh G.P.** (2000). Evaluation of oxidative stress befor and after control of glycemia and after Vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism*. **49**: 160-162.
- Shati A.A.** (2014). Ameliorative effect of vitamin E on potassium dichromate-induced hepatotoxicity in rats. **26** (3) : 181-189.
- Sies H.** (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am JMed*. **91**: 31-38.
- Simic M.G., Jovanovic S.V.** (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. *J Am chem Soc*. **111**: 5778-5782.
- Sofic E., Paulus W., Jellinger K., Riederer P., Youdim M.B.H.** (1991). Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem*. **56**: 978-82.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C.** (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad Biol Med*. **33** (5): 575-86.
- Spiegelman B.M., Flier J.S.** (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Molec Cell*. **104**: 531-43.
- Spina M.B., Cohen G.** (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: implication for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 1398-400.
- Stevens J., Liu H., Halleck M., Bowes R.C., Chen Q.M., Van de Water B.** (2000). Linking gene expression to mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters*. **15**: 479-486.
- Stoner G.D., Mukhtar H.** (1995). Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of cellular biochemistry*. **22**: 169-180.
- Storz P., Jakob U., Reichmann D.** (2013). Oxidative Stress in Cancer, Oxidative Stress and Redox Regulation, Media Dordrecht. 427-447.
- Swartz H.M., Sarna T., Zecca L.** (1992). Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann Neurol*. **32**: 69-75.
- Talebanzadeh S., Ashrafi M., Kazemipour N., Erjaee H., Nazifi S.** (2018). Evaluation of the effects of saffron aqueous extract on oxidative stress in the lens of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedical Research and Therapy*. **5** (4): 2133-2141.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tarr J.M., Kaul K., Chopra M., Kohner E.M., Chibber R.** (2013). Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 1-13.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* **279**: 1005-28.
- Thays K.S., Mariane F.W., Niara M., Jéssica B.M., Fabiana A., Cláudia F., Caroline D.** (2016). Evaluation of antioxidant activity of grapevine leaves extracts (*Vitis labrusca*) in liver of Wistar rats. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* **88** (1) : 187-196.
- Thérond P.** (2003). Le sélénium : Un oligo-élément essentiel pour la santé humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* **38** (4) : 250-256.
- Tigrine C.** (2014). Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de Cléome arabica. Thèse de Doctorat de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. p : 132.
- Tillement J.H.** (2001). Protection in vitro des fonctions mitochondriales cérébrales par le E resveratrol dans les états d'anoxie suivie de réoxygénation. *Bull.Acad.Med.* **185** (8) : 1429-1445.
- Tounsi M.S., Wannas W.A., Ouerghemmi I., Jegham S., Ben Njima Y., Hamdaoui G., Zemni H., Marzouk B.** (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian *Citrus* varieties. *J Sci Food Agric.* **91** (1): 142-151.
- Turrens J.F., Boveris A.** (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* **191**:421-427.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39** (1): 44-84.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Int.* **160** (1): 1-40.
- Wanges P.A., Silbajoris R., Speen A., Brighton L., Henriquez A., Tong H., Bromberg P.A., Simmons S.O., Samet J.M.** (2014). Role of H₂O₂ in the oxidative effects of zinc exposure in human airway epithelial cells. *Redox Biology.* **3**: 47-55.
- Wellen K.E., Thompson C.B.** (2010). Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molec Cell.* **40**: 323-32.
- Wu S.B., Wu Y.T., Ma Y.S., Yau-Huei Wei Y.H.** (2011). Oxidative stress and its biochemical consequences in mitochondrial DNA mutation-associated diseases: implications of redox therapy for mitochondrial diseases. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates. Molecular Aspects of Cell Signaling.* p: 33-49.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Xia L., Wang H., Goldberg H.J., Munk S., Fantus I.G., Whiteside C.I.** (2006). Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* **290** (2): 345-56.
- Yabe-Nishimura C.** (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews.* **50** (1) : 21 - 33.
- Yamada T., Hayasaka S., Shibata Y., Ojima T., Saegusa T., Gotoh T., Ishikawa S., Nakamura Y., Kayaba K.** (2011). Frequency of *citrus* fruit intake is associated with the incidence of cardiovascular disease: the Jichi Medical School cohort study. *J Epidemiol.* **21** (3): 169-175.
- Yerneni K.K., Bai W., Khan B.V., Medford R.M., Natarajan R.** (1999). Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* **48** (4): 855-64.
- Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Toyokuni S.** (2000). Free radical in chemistry, biology and medicine. Ed. Oica International, London. p: 31-42.
- Zargar S., Jamal Siddiqi N., Khalaf Al Daihan S., Wani T.A.** (2015). Protective effects of quercetin on cadmium fluoride induced oxidative stress at different intervals of time in mouse liver. *Acta Biochimica polonica.* **62**: 207-213.
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.** (2002). 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.* **33**: 337-349.
- Zhang L., Jope R.S.** (1999). Oxidative stress differentially modulates phosphorylation of ERK, p38 and CREB induced by NGF or EGF in PC12 cells. *Neurobiol Aging.* **20** (3): 271-8.