

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

**Le rôle des antioxydants dans la lutte contre le stress  
oxydatif**

Filière : Sciences Biologiques

Présenté par :

**MAICHE Roumaissa  
BENOUDINA Marwa**

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 : 2019/2020**

# REMERCIEMENT

*Nous* exprimons d'abord nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à mademoiselle Kadeche Lilia. Maître de conférences au Centre Universitaire 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 au Centre Universitaire 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 au Centre Universitaire 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.

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à : mes chers parents, ma chère grand- mère et mon mari qui tiennent une place immense dans mon cœur. Papa, Maman, Adel, mon oncle Omar et Mourad vous resterez toujours une vraie école de la vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec vous.*

*Vous avez toujours été là pour moi, et à aucun moment vous n'avez cessé de me couvrir de votre tendresse.*

*Pour votre patience dans les moments difficiles et votre amour constant, recevez ce mémoire en guise de remerciement et témoignage de ma plus profonde gratitude.*

*A mes chères sœurs MAISSA et CHAIMA.*

*A mes cher frères MOHAMED CHIRIF et ABDALAH*

*A tout la famille MAICHE, BOUTOITOU, OUAHAB, BENSAOUD*

*A toute mes amies*

*A tous ceux qui me sont chers*

*A tous ceux qui m'aiment*

*A tous ceux que j'aime.*

**ROUMAÏSSA**

# Dédicace

*Je dédie ce mémoire à : mes chers parents, qui tiennent une place immense dans mon cœur. Papa, Maman vous resterez toujours une vraie école de la vie, je ne cesse d'apprendre tous les jours avec vous.*

*Vous avez toujours été là pour moi, et à aucun moment vous n'avez cessé de me couvrir de votre tendresse.*

*Pour votre patience dans les moments difficiles et votre amour constant, recevez ce mémoire en guise de remerciement et témoignage de ma plus profonde gratitude.*

*A mes chères sœurs NIHAD, ZINEB et sa fille RANIM*

*A mes cher frères HALIM, OUSSAMA et sa femme FAIZA et son fils  
NAZIM*

*A tout la famille BENOUDINA, GUIDOUM*

*A toute mes amies*

*A tous ceux qui me sont chers*

*A tous ceux qui m'aiment*

*A tous ceux que j'aime.*

**MARWA**

# TABLES DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

*ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

*INTRODUCTION* 01

*CHAPITRE I. Stress oxydant :*

I. Stress oxydant	03
1. Radicaux libres	03
1.1. Généralité sur les radicaux libres	03
1.2. Les radicaux libres biologiques	03
2. Définition du stress oxydant	04
3. Mécanismes de production des principales ERO	05
3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	05
3.2. Le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$	05
3.3. Le radical hydroxyle $HO^{\cdot}$	06
3.4. L'oxygène singulet $^1O_2$	06
4. Sources des ERO ou ROS	07
4.1. Sources endogènes	07
4.2. Sources exogènes	11
5. Cibles biologiques des ROS	11
5.1. Peroxydation lipidique	11
5.2. Oxydation des protéines	12
5.3. Oxydation de l'ADN	14

*CHAPITRE II. Antioxydants :*

1. Définition	16
2. Mode d'action des antioxydants	16
3. Les systèmes de défense antioxydants	17
3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques	17
3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	22
3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogène	23
3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes	25

*CHAPITRE III. Stress oxydant et pathologies :*

1. Exemples des maladies liées au SO	33
1.1. Diabète de type 2	34

1.2. Vieillessement	37
1.3. L'obésité	38
1.4. Cancer	39
1.5. Maladie de Parkinson	40
1.6. L'athérosclérose	41
<b><i>CHAPITRE IV : Méthodes de dosage des biomarqueurs et Discussion d'études</i></b>	
I. Méthodes de dosage des biomarqueurs du stress oxydatif	42
1. Le choix des biomarqueurs du stress oxydant	42
2. Méthodes de dosage des principaux biomarqueurs du stress oxydatif	43
2.1. Dosage du glutathion réduit (GSH)	43
2.1.1. Dosage des protéines	44
2.2. Dosage de malondialdéhyde (MDA)	45
2.3. Dosage de l'activité de la GPx	46
2.4. Dosage de la catalase (CAT)	47
II. Discussion d'études	50
<b><i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i></b>	53
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i></b>	54

# LISTE DES ABRÉVIATIONS



## **ABRÉVIATIONS**

### **Enzymes/ions/substances :**

<b>%</b>	: Pourcentage
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>1O2</b>	: Oxygène singulier
<b>4-HNE</b>	: 4-hydroxy-2-nonéal
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>AGPI</b>	: Acides gras polyinsaturés
<b>ATP</b>	: Adenosine Tri-Phosphate
<b>BSA</b>	: Albumine sérique bovine
<b>CAT</b>	: Catalase
<b>ClO<sup>-</sup></b>	: Ion hypochlorite
<b>Coq10</b>	: Coenzyme Q10
<b>CRM</b>	: Chaîne respiratoire mitochondriale
<b>Cu</b>	: Cuivre
<b>DAG</b>	: Diacylglycérol
<b>DO</b>	: Densité optique
<b>DRO</b>	: Dérivés réactifs de l'oxygène

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>DTNB</b>	: Dithio-bis-2-nitrobenzoïque
<b>EAO</b>	: Espèce Active de l'Oxygène
<b>ERA</b>	: Espèces réactives dérivées de l'azote
<b>ERO</b>	: Espèces réactives oxygénées
<b>ETC</b>	: Chaîne de transport d'électrons
<b>FADH2</b>	: Flavine adénosine dinucléotide
<b>Fd</b>	: Facteur de dilution
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	: Ion ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	: Ion ferrique
<b>FRO</b>	: Formes réactives de l'oxygène
<b>g</b>	: Gramme
<b>GFAT</b>	: Glutamine:fructose-6 phosphateamino Transférase
<b>Gpx</b>	: Glutathion peroxydases.
<b>GR</b>	: Glutathion réductase
<b>GSH</b>	: Glutathion réduit
<b>GSHPX</b>	: Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	: Glutathion oxydé

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>GST</b>	: Glutathion S- transférase
<b>h</b>	: Heure
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Eau
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Peroxyde d'hydrogène
<b>HclO</b>	: L'acide hypochloreux
<b>HO°</b>	: Radical hydroxyle
<b>HO<sub>2</sub>·</b>	: Hydroperoxyde
<b>L</b>	: Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique
<b>L</b>	: Litre
<b>L- DOPA</b>	: L-dihydroxyphénylalanine
<b>LDL</b>	: Lipoprotéine de base densité
<b>L-TOPA</b>	: L-trihydroxyphénylalanine
<b>MAO</b>	: Mono-amine oxydase
<b>MDA</b>	: Malondialdéhyde
<b>mg</b>	: Milligramme
<b>min</b>	: Minute
<b>ml</b>	: Millilètre.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>Mm</b>	: Milimole
<b>Mn</b>	: Manganèse
<b>Mn-SOD</b>	: Superoxydedismutase associée au manganèse
<b>Mol</b>	: Mole
<b>MP</b>	: Maladie de Parkinson
<b>MPO</b>	: Myéloperoxydase
<b>MPO</b>	: Myéloperoxydase
<b>NAD<sup>+</sup></b>	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADH</b>	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduite
<b>NADPH</b>	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>nM</b>	: Nanomètre
<b>nmol</b>	: Nanomole
<b>NO•</b>	: Monoxyde d'azote
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	: Dioxyde d'azote
<b>NOX</b>	: NAD(P)H oxydase membranaire
<b>NOX</b>	: NADPH oxydase
<b>O<sub>2</sub></b>	: L'oxygène ou dioxygène
<b>O<sub>2</sub>•-</b>	: Anion superoxyde
<b>O<sub>3</sub></b>	: Ozone

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>ONOO.-</b>	: Peroxynitrite
<b>ONOOH</b>	: Nitroperoxyde
<b>Ph</b>	: potentiel hydrogène.
<b>PKC</b>	: protéine kinase C
<b>Prx</b>	: Peroxirédoxines .
<b>RL</b>	: Radical libre.
<b>RLO</b>	: Radicaux libres oxygénés.
<b>RO<sup>•</sup></b>	: Alkoxye
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	: Peroxyle
<b>ROO<sup>•</sup></b>	: Radicaux peroxyes
<b>ROS</b>	: Reactive Speaces Oxygen.
<b>SDH</b>	: Sorbitol déshydrogénase.
<b>Se</b>	: Sélénium.
<b>Se-GPx</b>	: glutathionperoxydase séléno-dépendante
<b>SN</b>	: Substance Noire.
<b>SO</b>	: Stress oxydant ou stress oxydatif
<b>SOD</b>	: Superoxyde dismutase.
<b>TBA</b>	: Thiobarbiturique.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

<b>TCA</b>	: Trichloroacétique
<b>TRX</b>	: Thiorédoxines
<b>TRXR</b>	: Thiorédoxine réductase
<b>UV</b>	: Ultra-Violet.
<b>VTC</b>	: Vitamine C
<b>VTE</b>	: Vitamine E
<b>Zn</b>	: Zinc
<b><math>\alpha</math>-TOH</b>	: $\alpha$ -tocophérol.
<b><math>\Delta</math>DO</b>	: Variation de la densité optique par minutes
<b><math>\epsilon</math></b>	: Coefficient d'extinction du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b><math>\mu</math>l</b>	: Microlitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Micromole

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

**LISTE DES FIGURES**

<b>FIGURE</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>Figure 1</b>	Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits	05
<b>Figure 2</b>	Représentation schématique d'une mitochondrie de la chaîne respiratoire (I : NADPH, II : succinate déshydrogénase, III : complexe cytochrome bc1, IV : cytochrome C oxydase et V : ATP synthase)	07
<b>Figure 3</b>	Sites de production intracellulaire des ERO	09
<b>Figure 4</b>	La NADPH oxydase (Nox-2) des phagocytes	10
<b>Figure 5</b>	Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	12
<b>Figure 6</b>	La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle	14
<b>Figure 7</b>	Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH: glutathion, Cl <sup>-</sup> : anion chlorure; MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathionperoxydase séléno-dépendante	17
<b>Figure 8</b>	Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	18
<b>Figure 9</b>	Structures de la (A) SOD1, (B) SOD2 et (C) SOD3	19
<b>Figure 10</b>	Structure de la CAT	19
<b>Figure 11</b>	Structure de la Gpx	20
<b>Figure 12</b>	Cycle d'élimination de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par le GSH	21
<b>Figure 13</b>	États d'oxydation du glutathion	23
<b>Figure 14</b>	Structure de l'acide ascorbique	26
<b>Figure 15</b>	Régénération de la vitamine E par la vitamine C	26
<b>Figure 16</b>	Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique	28
<b>Figure 17</b>	Structure du β-carotène	28
<b>Figure 18</b>	Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes	29
<b>Figure 19</b>	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires	32



## TABLES DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 20</b>	La place centrale du stress oxydant au sein des pathologies	33
<b>Figure 21</b>	: Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Amplification de la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire induite par une entrée massive de glucose dans la cellule suivant un épisode hyperglycémique)	35
<b>Figure 22</b>	Voie des polyols	35
<b>Figure 23</b>	Voie des hexosamines	36
<b>Figure 24</b>	L'interaction du stress oxydant avec le vieillissement	37
<b>Figure 25</b>	L'interaction du stress oxydant avec l'obésité	38
<b>Figure 26</b>	Structure de la paroi artérielle	41
<b>Figure 27</b>	la formation d'une plaque d'athérosclérose	41
<b>Figure 28</b>	Principe de dosage du glutathion	43
<b>Figure 29</b>	la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines	45
<b>Figure 30</b>	Principe de dosage du malondialdéhyde	45

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>Tableau 1</b>	Principales ERO radicalaires et non-radicalaires	04
<b>Tableau 2</b>	Principaux modes d'action de quelques antioxydants	16

RÉSUMÉS

### الملخص

الإجهاد التأكسدي هو ظاهرة غير طبيعية تعاني منها أحياناً خلايانا أو أحد أنسجتنا عندما يتعرضون لإنتاج داخلي أو خارجي للجذور الحرة للأكسجين التي تتجاوز قدراتها المضادة للأكسدة. فائض الجذور الحرة التي لم يتم تثبيطها بواسطة أنظمة الدفاع يضر للغاية بالجزيئات الأساسية لخلايانا (الدهون ، البروتينات ، الحمض النووي).

الإجهاد التأكسدي هو أيضاً أحد العوامل التي تعزز تطور الأمراض المتعددة العوامل مثل السكري ومرض الزهايمر والروماتيزم وأمراض القلب والأوعية الدموية. يتطلب فهم الإجهاد التأكسدي معرفة جيدة لتفاعلية أنواع الأكسجين التفاعلية المختلفة (ROS) وآليات عمل أنظمة مضادات الأكسدة.

في هذا العمل، سنقوم بتفصيل أنظمة الأكسدة ومضادات الأكسدة الخلوية وتقديم امثلة على امراض لها علاقة بالإجهاد التأكسدي. سنناقش أيضاً الدراسات التي تبرز مضادات الأكسدة كوسيلة لمكافحة الإجهاد التأكسدي.

**الكلمات المفتاحية:** الجذور الحرة، أنواع الأكسجين التفاعلية، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، مضادات الأكسدة الطبيعية، الامراض المتعددة العوامل.

### ABSTRACT

Oxidative stress is an abnormal phenomenon occurring inside our cells or tissues when production of oxygen radicals (endogenous or exogenous) exceeds their antioxidant capacity. Excess of free radicals not neutralized by the defense systems is very damaging for the essential macromolecules of our cells (lipids, proteins, DNA).

Oxidative stress is also one of the factors that potentiate the development of multifactorial diseases such as diabetes, Alzheimer's disease, rheumatism and cardiovascular diseases. 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 examples of diseases related to oxidative stress. We will also discuss studies that seem to highlight antioxidants as a way to combat oxidative stress.

**Key words:** Free radicals, Reactive oxygen species, Oxidative stress, Antioxidants, Natural antioxidants, Multifactorial diseases.

### RÉSUMÉ

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production, endogène ou exogène, de radicaux libres oxygénés qui dépasse leurs capacités antioxydantes. L'excès de radicaux libres non neutralisés par les systèmes de défense est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules (lipides, protéines, ADN).

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. 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 des exemples de maladies liées au stress oxydant. Nous discuterons aussi des études qui semblent mettre en évidence les antioxydants comme un moyen pour lutter contre le stress oxydant.

**Mots clé :** Radicaux libres, Espèces réactives de l'oxygène, Stress oxydant, Antioxydants, Antioxydants naturels, Maladies multifactorielles.

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

## Introduction

L'oxygène (ou dioxygène, O<sub>2</sub>) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes (Steinberg et al., 1989).

Les conséquences de l'activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, les mitochondries fournissent à la cellule, grâce à l'oxygène, une source d'énergie importante sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique. D'autre part, une faible fraction de l'oxygène (environ 0,4 à 4%) n'est pas correctement convertie en eau suite à des imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxygène donne alors naissance à des espèces réactives de l'oxygène (ERO) parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle (Haleng et al., 2007).

Ces ERO, utiles à l'organisme à faibles doses, sont produits par divers mécanismes physiologiques. Elles jouent, en effet, 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).

En fait, la nature instable des EROs les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (Haleng et al., 2007).

Toutefois, un maintien d'un niveau non cytotoxique d'ERO est assuré par des systèmes dits antioxydants, développés par l'organisme. Ces systèmes comprennent des enzymes qui catalysent la réduction des 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) (Bouayed, 2010 ; Lushchak, 2011 ; Regoli et Giuliani, 2014). Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires, c'est le stress oxydant (Dröge, 2002).

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est donc un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées qui vont s'attaquer aux membranes cellulaires, aux protéines et à l'ADN. 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 anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Favier, 2003).

L'évaluation du stress oxydant peut donc s'avérer utile en pratique clinique, afin de comprendre les mécanismes de déclenchement et de développement de ces pathologies et de développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques. La possibilité d'évaluer les causes (production d'ERO), les conséquences (dommages oxydatifs) et les réponses de l'organisme (système antioxydant) au stress oxydant constitue un important intérêt à l'évaluation de ces marqueurs (Ruas et al., 2008).

Au vu de ces données, ce travail est une revue de littérature introduisant le concept du stress oxydant. Les sources des EROs et leurs conséquences biologiques sont abordées dans un premier temps. Les différents types et sources d'antioxydants, sont ensuite présentés. D'autre part, nous avons mentionné les différentes pathologies liées au stress oxydant et nous nous sommes aussi intéressés dans ce mémoire, de présenter les principales méthodes utilisées pour le dosage des marqueurs du stress oxydant ; et les résultats de recherches précédentes qui ont été menées dans le but de comprendre et de lutter contre ce phénomène.

Enfin, avant de présenter les perspectives sur les quelles ce sujet serait susceptible de déboucher, ce mémoire sera terminé par une conclusion générale.



# ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUES

# CHAPITRE I. STRESS OXYDANT

## I. Stress oxydant

### 1. Radicaux libres

#### 1.1. Généralité sur les radicaux libres

En révisant la littérature, on remarque souvent un point symbolique à côté d'une abréviation chimique telle que ( $\cdot\text{OH}$ ), ce point signifie un radical libre (Scheibmeir et al., 2005). La présence des radicaux libres dans les matières biologiques a été découverte à moins de 50 ans (Dröge, 2002).

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André., 2004). La présence d'électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices (Bonfont-Rousselot et al., 2003).

En fait, un radical libre est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

L'instabilité des radicaux libres rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques ; leurs constantes de vitesse réactionnelles variables selon leurs natures, sont très élevées et peuvent aller de  $10^5$  à  $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  (Bonfont-Rousselot et al., 2003).

#### 1.2. Les radicaux libres biologiques

En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' $\text{O}_2$  (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 Anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , et le radical hydroxyle  $\text{OH}^{\cdot}$ ; ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $\text{NO}^{\cdot}$ .

\* **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) (tab.1)

**Tableau 1:**Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Dwassy, 2014)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non radicalaire
Radical superoxyde: $O_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène: $H_2O_2$
Radical hydroxyle: $OH^{\cdot}$	Ion hypochlorite: $ClO^-$
Peroxyde: $RO_2^{\cdot}$	Ozone: $O_3$
Alkoxyde: $RO^{\cdot}$	Oxygène singulet: $^1O_2$
Hydroperoxyde: $HO_2^{\cdot}$	Peroxynitrite: $ONOO^-$

Dans les circonstances quotidiennes normales, ces ERO sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense (antioxydants) 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 et sont alors à l'origine d'un stress oxydant (SO) (Kim et al., 2009).

## 2. Définition du stress oxydant

Comme cité précédemment, des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/anti-oxydants est en équilibre. Mais, l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'ERO devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés

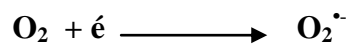
pro-oxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier, 2003).

### 3. Mécanismes de production des principales ERO

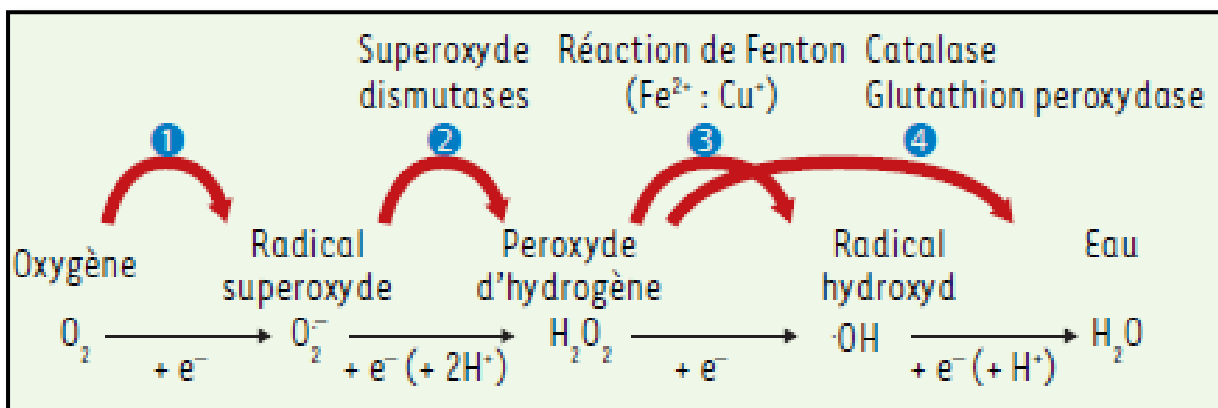
Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales (fig.1): l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) :

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

L'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  constitue le précurseur de la plupart des ERO et induit les réactions oxydatives en chaîne (Abele et al., 2002). C'est l'espèce la plus couramment générée par la cellule, par réduction d'une molécule d' $O_2$  (Wolin, 1996). A l'état fondamental, l' $O_2$  est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003). 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).



Les anions superoxydes ne sont pas très réactifs et ont une demi-vie courte, mais ils constituent des radicaux précurseurs et ils exercent leurs effets par la formation d'espèces radicalaires beaucoup plus réactives (Ronald St-Louis, 2011).

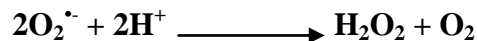


**Figure 1 :** Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits (Camille et al., 2011)

#### 3.2. Le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$

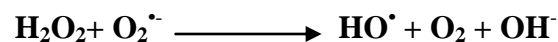
Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (appelé également eau oxygénée) est formé par l'addition d'un second électron sur l' $O_2^{\cdot-}$  donnant comme intermédiaire l'anion peroxyde  $O_2^{2-}$ , qui se

protone facilement pour donner  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Toutefois, la principale production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  résulte de la dismutation de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  selon la réaction suivante (Daum-Badouard, 2006):

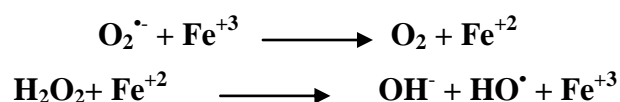


### 3.3. Le radical hydroxyle $\text{HO}^{\cdot}$

Le radical hydroxyle, est généré par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss), engendrant alors un ion  $\text{OH}^-$  inoffensif et un radical hydroxyle  $\text{HO}^{\cdot}$  (Comhair et Erzurum, 2002) :



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais, en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  donne naissance in vivo via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle  $\text{HO}^{\cdot}$  hautement réactif (Goldstein et al., 1993).

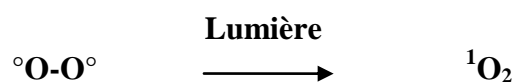


Les réactions en chaîne représentent l'un des plus grands dangers du radical  $\text{OH}^{\cdot}$ . En revanche, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  ne sont pas suffisamment réactifs pour déclencher des réactions en chaîne (Lau et al., 2008; Aprioku, 2013).

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 $^1\text{O}_2$

L'oxygène singulet n'est pas un radical libre parce qu'il ne contient pas d'électrons non appariés, mais formé dans certaines réactions radicales (Shiv, 2011). Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante (Justine et al., 2005) :



L'oxygène singulet est un agent oxydant très puissant qui peut directement oxyder des protéines, l'ADN et des lipides et causer des dommages tissulaires (Halliwell, 2006).

#### 4. Sources des ERO ou ROS

Les différents types des ROS sont produits d'une manière endogène lors du métabolisme mitochondrial, dans le peroxysoxe ainsi que par une variété de système d'enzymes cytosoliques. En outre, un certain nombre d'agents extérieurs peuvent déclencher la production de ROS (Taibur et al., 2012).

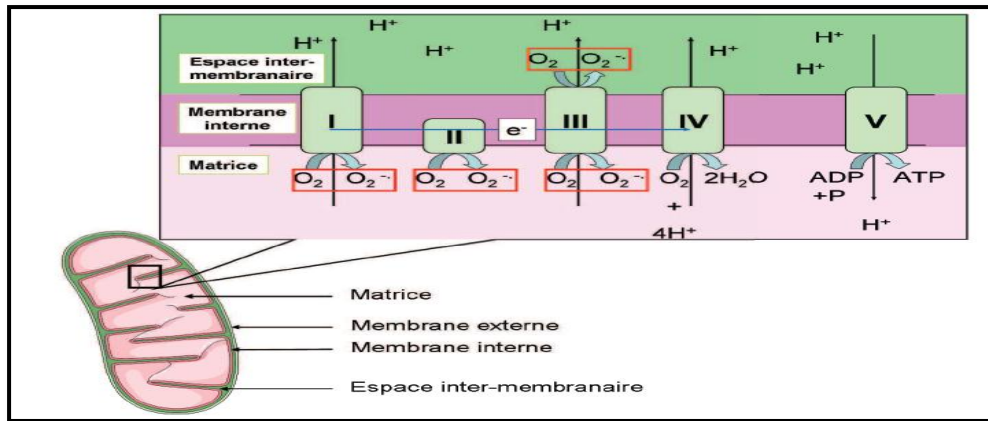
##### 4.1. Sources endogènes

- *Mitochondrie*

La mitochondrie est considérée comme une des principales sources de ROS dans la cellule par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. 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 chaîne respiratoire mitochondriale est la résultante de l'association d'une cinquantaine de polypeptides et permet la production d'énergie sous forme d'ATP en utilisant le dioxygène. Elle est composée de cinq complexes protéiques (I à V) situés dans la membrane interne des mitochondries (fig.2).

Cette chaîne respiratoire utilise deux transporteurs d'électrons, le nicotinamide adénosine dinucléotide (NADH) et le flavine adénosine dinucléotide (FADH<sub>2</sub>), pour faire subir à l'oxygène une réduction tétravalente par addition de 4 électrons (e<sup>-</sup>) et de 4 protons (H<sup>+</sup>) conduisant à la production d'eau (Mandavilli et al., 2002). Or, des réductions à un seul électron, produisant des anions superoxyde (fig.2), peuvent aussi survenir (Abele et al., 2002).



**Figure 2 :** Représentation schématique d'une mitochondrie et de la chaîne respiratoire. (I : NADH déshydrogénase, II : succinate déshydrogénase, III : complexe cytochrome bc1, IV : cytochrome C oxydase et V : ATP synthase)

Le passage d'électrons (représenté schématiquement par la flèche bleue) à travers les complexes de la chaîne respiratoire permet la translocation de protons dans l'espace inter-membranaire. Ce gradient de protons est utilisé par le complexe V pour produire l'ATP à partir de l'ADP. L'accepteur final d'électrons, le complexe IV réduit l'oxygène en eau. Encadrés en rouge : site de formation du radical superoxyde (Jean-Philippe, 2013).

La réduction partielle d'oxygène dans la mitochondrie est due à la fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire qui a lieu dans la membrane interne mitochondriale. Cette fuite se produit principalement au niveau des complexes I et III, et mène à la production du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le précurseur des ROS (Turrens, 1997; Mc Lennan et Degli Esposti, 2000).

- ***Peroxisomes***

Un peroxysome est un organe cellulaire entouré par une membrane simple et ne contenant pas de matériel génétique. Il contient de nombreuses enzymes générant une grande quantité d' $H_2O_2$ . Toutefois, l' $H_2O_2$  généré est rapidement détoxifié par la catalase peroxysomale, qui joue un rôle particulier dans l'homéostasie. Cette réaction est particulièrement rénale et hépatique puisqu'un dysfonctionnement de la catalase peroxysomale accélère l'atteinte rénale chez les patients diabétiques (Hwang et al., 2012).

- ***Réticulum endoplasmique***

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Turrens et al., 1982 ; Freeman et al., 1983). La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS (Morel et Barouki, 1999).



Ainsi, il existe de nombreuses autres sources de ROS (fig.3) parmi lesquelles l'autooxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase :

- *L'autooxydation de molécules*

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS (Freeman et Crapo, 1981). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives notamment lors de la maladie de Parkinson (Thannickal et Fanburg, 2000).

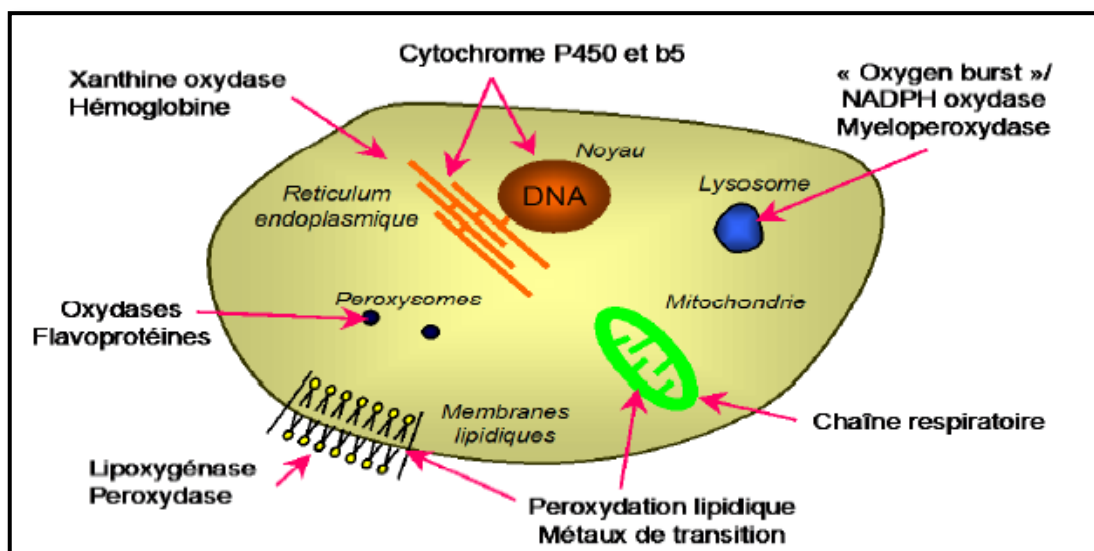
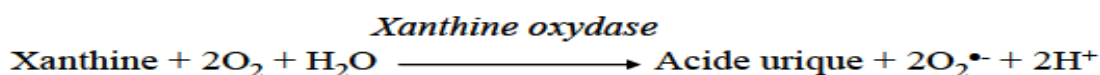


Figure 3 : Sites de production intracellulaire des ERO (Aïra, 2012)

- *Xanthine oxydase*

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Blandine Garait, 2006).

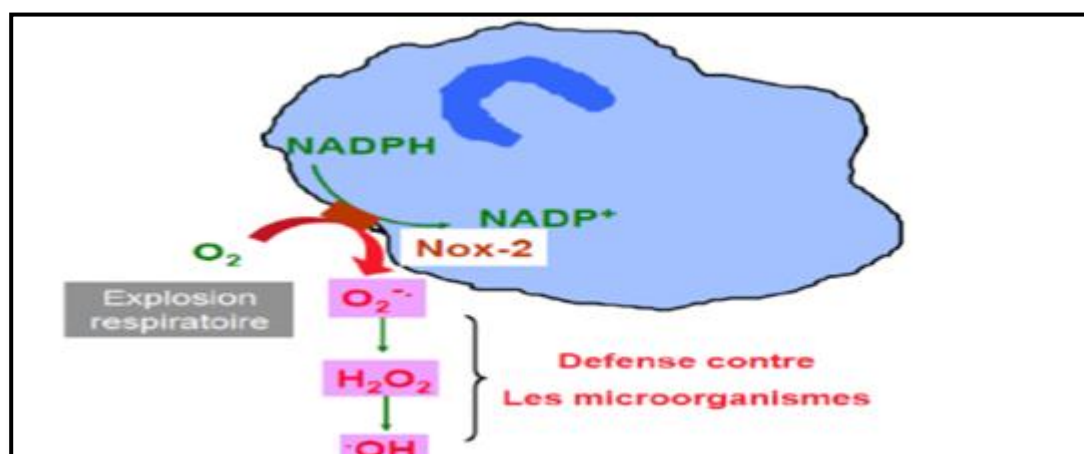
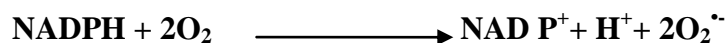


- *NADPH oxydase*

Les NADPH oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent  $O_2^{\bullet -}$  en utilisant NADH ou NADPH comme substrat (Mabile et al., 1997).

En parallèle de la production d'ERO par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$  via une activité NADPH oxydase membranaire (NOX), qui est présente dans la membrane plasmique des phagocytes (Krause, 2004).

La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction mono électronique de l' $O_2$  en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons :



**Figure 4 :** La NADPH oxydase (Nox-2) des phagocytes (Cillard, 2011)

La NOX a été initialement étudiée dans les cellules phagocytaires (fig.4) où elle joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes, mais elle existe également dans toutes les autres cellules non phagocytaires où elle participe à la signalisation cellulaire (Camille et Mireille, 2011). Selon le type cellulaire, la NOX peut libérer  $O_2^{\bullet -}$  de la cellule de manière préférentielle vers l'extérieur (cellules phagocytaires) ou vers l'intérieur (cellules non phagocytaires) (Guichard et al., 2006).

## 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 (William, 2013) :

- ✓ L'exposition aux rayons UV, aux ultrasons, aux micro-ondes et à des champs magnétiques:

Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou gamma soit en activant des molécules photo sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Favier, 2003) ;

- ✓ L'exposition aux métaux lourds ;
- ✓ Le contact avec des agents cancérogènes ;
- ✓ Le tabagisme et l'alcool ;
- ✓ La prise de médicaments et de la pilule contraceptive ;
- ✓ La pratique trop intense ou mal gérée d'un sport ;
- ✓ Le stress intellectuel ou émotionnel ;
- ✓ La pollution.

## 5. Cibles biologiques des ROS

Les produits de la réduction incomplète de l' $O_2$  tels que le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et même l' $O_2$  sont toxiques et endommagent les macromolécules cellulaires.

Les ERO sont des espèces chimiques à très forte réactivité vis-à-vis des composants cellulaires. Ces réactions altèrent les propriétés intrinsèques des membranes tels que la fluidité, le transport des ions, la perte des activités de certaines enzymes, la dénaturation des protéines, l'inhibition de la synthèse protéique et l'altération de l'ADN, ce qui conduit à la mort cellulaire (Raja, 2011).

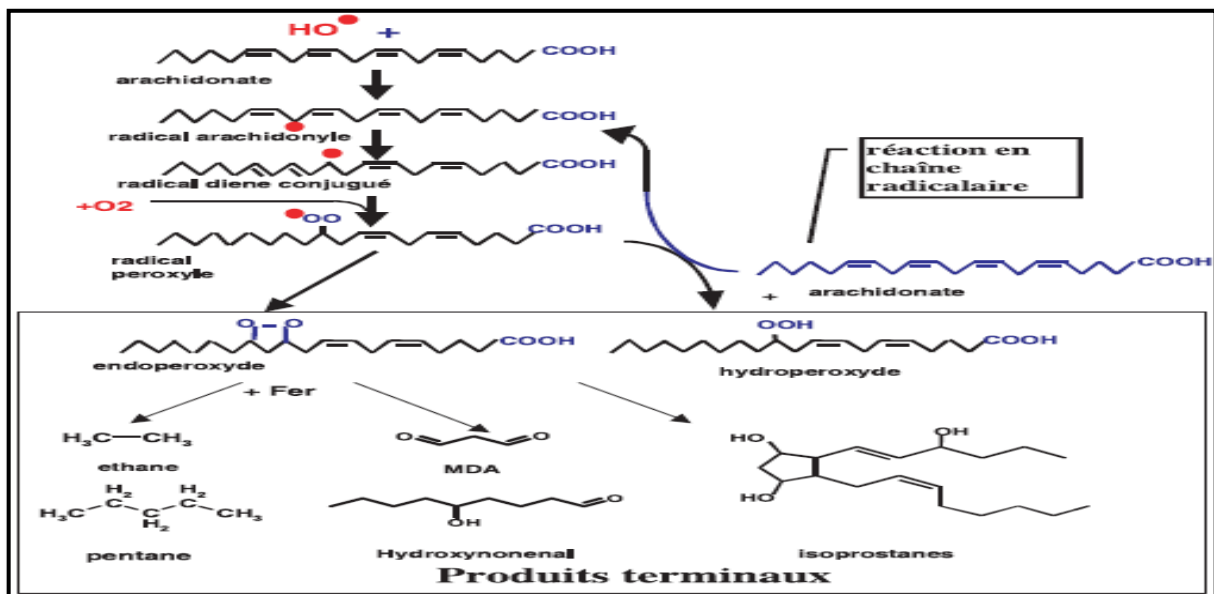
### 5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés

(AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ;Pamplona et al., 2000).

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al., 2004). Dès lors la perméabilité au calcium augmentée, la fixation aux récepteurs altérée. Tout ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants (Mc Michael, 2007).

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4 hydroxynonenal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (fig.5).



**Figure 5 :** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003)

## 5.2. Oxydation des protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger la majorité des ERO générés (50- 75%). (Clarkson et al., 2000 ; Bloomer et al., 2004 ; Fisher-Wellman et al., 2009).

Dans les conditions physiologiques, les cibles majeures des EROs sont les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) (Brot et Weissbach, 2000 ; Finkel, 2000), les acides aminés basiques (arginine, lysine) (Stadtman, 1993 ; Uchida et al., 1998) et les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (Armstrong et Swallow, 1969 ; Huggins et al., 1993). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

#### ✓ **Oxydation des acides aminés basiques**

Les acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine) qui présentent des fonctions amines (NH ou NH<sub>2</sub>) sur leurs chaînes latérales sont particulièrement sensibles aux attaques radicalaires.

En présence de métaux, ils subissent une désamination oxydative conduisant à la formation d'un groupement carbonyle, ce qui entraîne une perte importante de la qualité nutritionnelle. Ainsi, ces groupements carbonyles peuvent réagir avec des fonctions amines non oxydées de la lysine pour former des liaisons imines (-HC=N-). Ces dernières, lorsqu'elles se forment entre des chaînes peptidiques différentes, peuvent conduire à l'agrégation des protéines (Khaled, 2017).

#### ✓ **Les acides aminés soufrés**

Certains acides aminés comme la cystéine (Cyst) et la méthionine (Met) sont particulièrement sensibles à l'oxydation via leur groupement thiol. Une fois oxydée, la cystéine conduit à plusieurs composés comme l'acide cystéique ou génère des ponts disulfures. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Finkel, 2000).

L'oxydation de la méthionine, particulièrement sensible au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, s'effectue en deux étapes : l'une réversible conduit au sulfoxyde de méthionine, l'autre irréversible, donne la sulfone de méthionine, cette réaction n'étant pas possible in vivo (Vogt, 1995).

#### ✓ **Oxydation des acides aminés aromatiques**

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) sont aussi très sensibles à l'oxydation, en subissant des réactions d'hydroxylation sur leurs noyaux aromatiques. La phénylalanine et la tyrosine peuvent être oxydées en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) ou L-trihydroxyphénylalanine (L-TOPA), ces deux produits d'oxydation étant potentiellement des composés mutagènes. L'oxydation de deux

tyrosines voisines peut conduire aussi à la formation de dityrosine, qui est un facteur important d'agrégation des protéines.

Le tryptophane est oxydé en hydroxytryptophane dont les métabolites (hydroxyindole et hydroxykinurénine) formés en milieu très oxydant, présentent une activité mutagénique élevée (khaled, 2017).

De même, les radicaux libres peuvent interagir avec différents types de protéines : celles de soutien comme le collagène (vieillesse), les protéines circulantes (transferrine, albumine) et les enzymes protéiques (Guillouty, 2016).

### 5.3. Oxydation de l'ADN

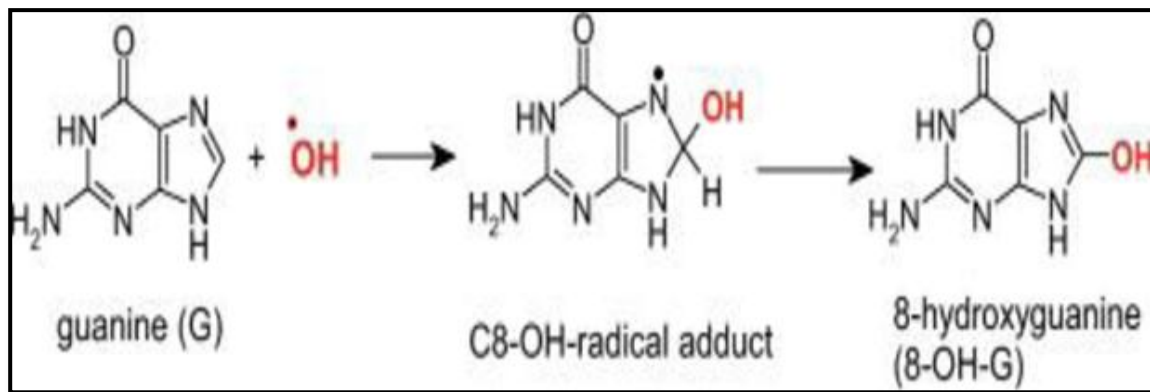
Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire. Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2) sa localisation proche de la membrane interne, 3) des mécanismes de réparations frustrés et 4) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Blandine, 2006).

Les ERO sont également responsables de l'altération de l'ADN, ce qui inclut la mutation des paires de base, leur réarrangement, la délétion ou l'insertion de quelques bases, ou encore l'amplification de certaines régions.

Les différents radicaux libres affectent l'ADN différemment. Par exemple, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ne réagissent pas avec les bases azotées de l'ADN. L'oxygène singulet quant à lui attaque spécifiquement la guanine et le radical hydroxyle attaque toutes les bases de l'ADN et génère une multitude de produits (Raja, 2011).

L'ADN peut réagir avec  $\text{OH}^\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Fonc, 2007).

La figure 6 illustre la réaction du radical hydroxyle avec l'ADN :



**Figure 6 :** La réaction de la base guanine avec le radical hydroxyle (Jomova et al., 2011)

Il existe des systèmes de réparation de l'ADN mais lorsqu'ils sont débordés, ces systèmes ne sont plus suffisants et cela entraîne des altérations du matériel génétique qui peuvent engendrer des mutations, des cancers (Guillouty, 2016).

## CHAPITRE II. ANTIOXYDANTS



## II. Antioxydants

Comme nous l'avons décrit, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants, pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène :

### 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). Ce sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées (Pelli et Lyly, 2003).

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).

### 2. Mode d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents (tab.2) :

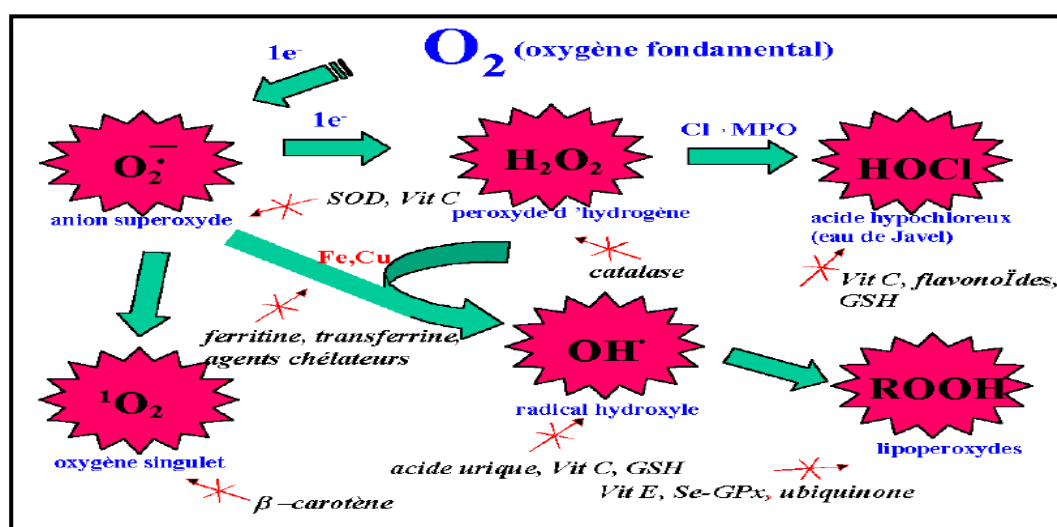
**Tableau 2** : Principaux modes d'action de quelques antioxydants (Justine et al.. 2005)

	Nature	Mode d'action
<b>Défenses non enzymatiques</b>	- Vitamine E - Vitamine C - Bêta carotène - Ubiquinone, Acide urique,.....	Fixation des métaux de transition
<b>Défenses enzymatiques</b>	Superoxyde dismutase	Catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$
	Catalase	Métabolise le $H_2O_2$
	Glutathion peroxydase	Réduction de $H_2O_2$ et les $HO_2^{\cdot}$

On distingue, en fait, 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).

### 3. Les systèmes de défense antioxydants

On distingue deux sources d'antioxydants (fig.7): l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng et al., 2007).

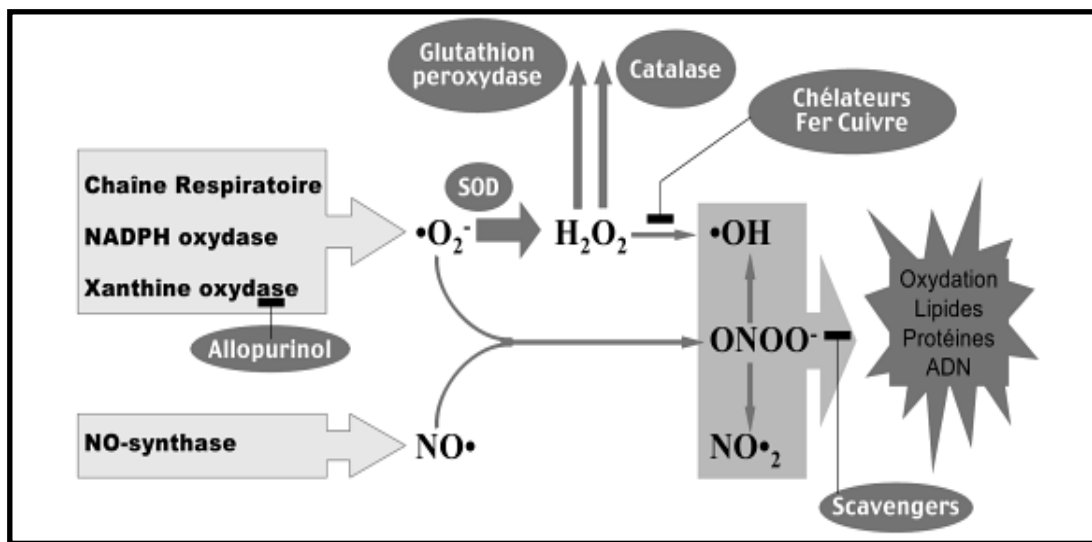


**Figure 7 :** Aperçu des espèces oxygénées activées (EOA) dérivant de l'oxygène et systèmes de protection permettant de limiter l'effet toxique de ces espèces. GSH: glutathion,  $Cl^-$ : anionchlorure; MPO: myéloperoxydase, SOD: superoxyde dismutase, Se-GPx: glutathionperoxydase séléno-dépendante (Pincemail, 1998)

#### 3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont d'origine endogène. Ces enzymes sont élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika et al., 2004).

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène. Ces différentes enzymes sont en interrelation dans la régulation du stress oxydant intracellulaire (fig.8) :



**Figure 8 :** Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène (Chérifa, 2014)

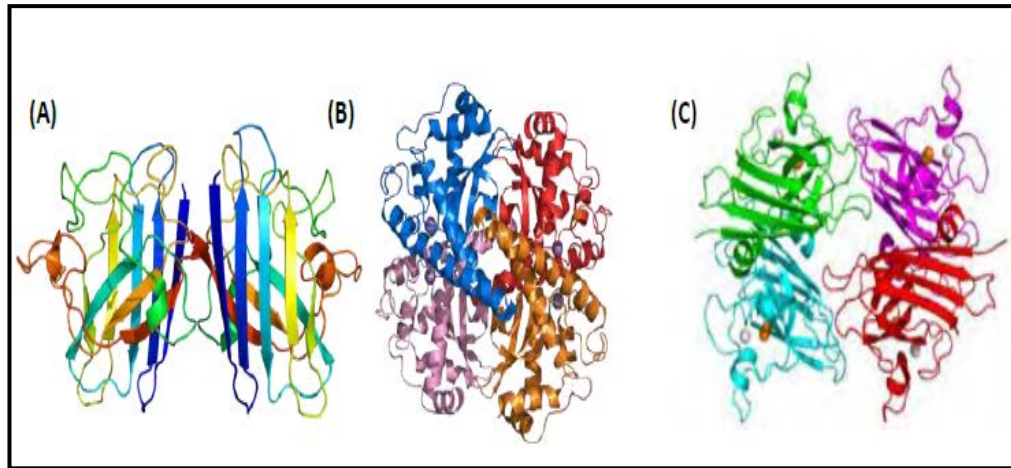
- *La Superoxyde dismutase(SOD)*

La SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est l'enzyme antioxydante « anti- l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> » la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale.

Elle est capable de transformer par dismutation de l'anion superoxyde, première espèce toxique en une molécule d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène qui est beaucoup moins réactif (Afonso et al., 2007) :



Chez l'homme, trois isoformes (fig.9) compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire : la SOD1 cytosolique et la SOD3 extracellulaire, utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Cu/Zn-SOD), alors que la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (Mn-SOD) (Afonso et al.,2007).



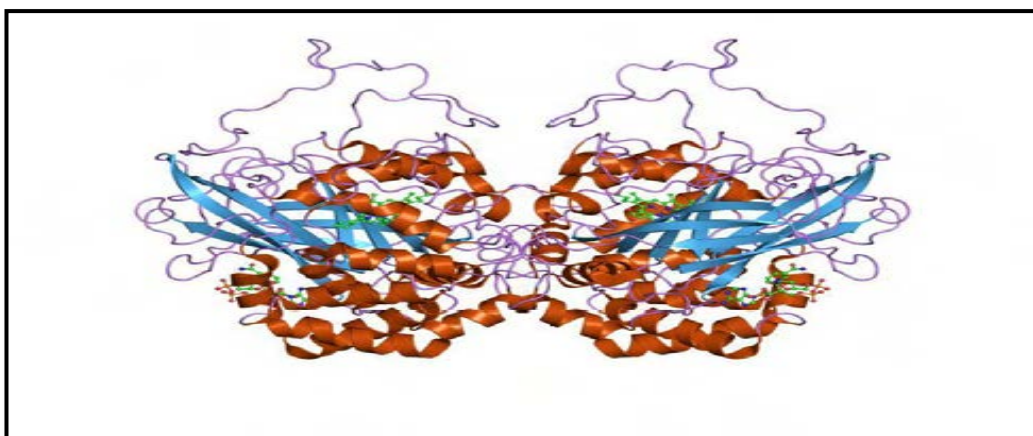
**Figure 9** : Structures de la (A) SOD1, (B) SOD2 et (C) SOD3 (Moumen et al., 1997)

- **La Catalase (CAT)**

Cette enzyme retrouvée spécifiquement dans les peroxysomes et les hématies. La catalase catalyse, d'où son nom, la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène, selon la réaction suivante :



La catalase est un homotétramère (fig.10) de 59 KDa, comportant 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec  $\text{Fe}^{3+}$  lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène.



**Figure 10** : Structure de la CAT (Skotheim, 1986)

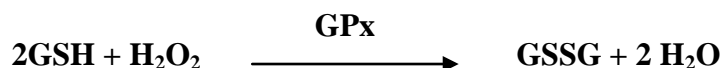
La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase. Le 3-amino-1,2,4-triazole en présence de peroxyde d'hydrogène est un inhibiteur de la catalase. Elle peut être inactivée par le peroxyde d'hydrogène à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$ . (Ko et al.,2000).

À haute concentration, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracellulaires entraîne donc une activation préférentielle de la catalase tandis que de très faibles concentrations seraient préférentiellement prises en charge par la GPx (Pamplona et Costantini, 2011).

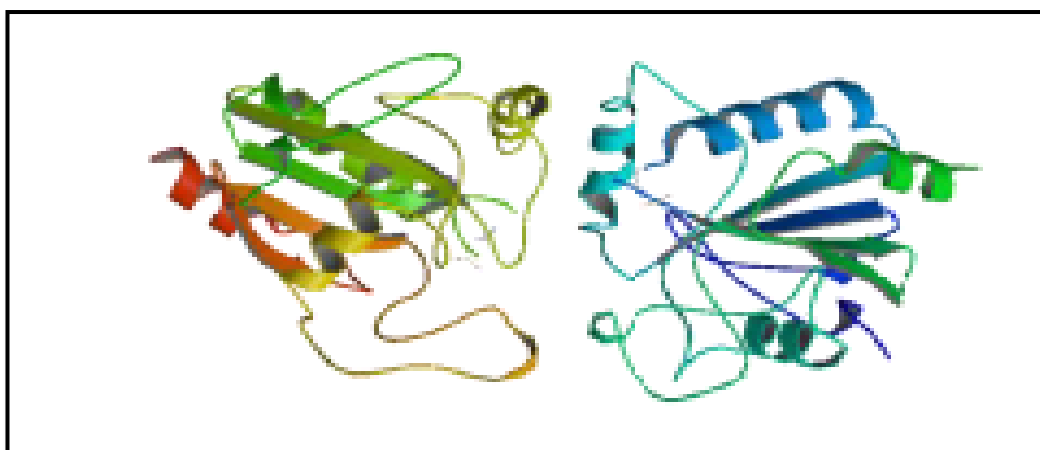
- ***La Glutathion peroxydase (GPx)***

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'étatredox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires.

Les GPx permettent la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'oxydation deson co-substrat le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (Zerargui, 2015).

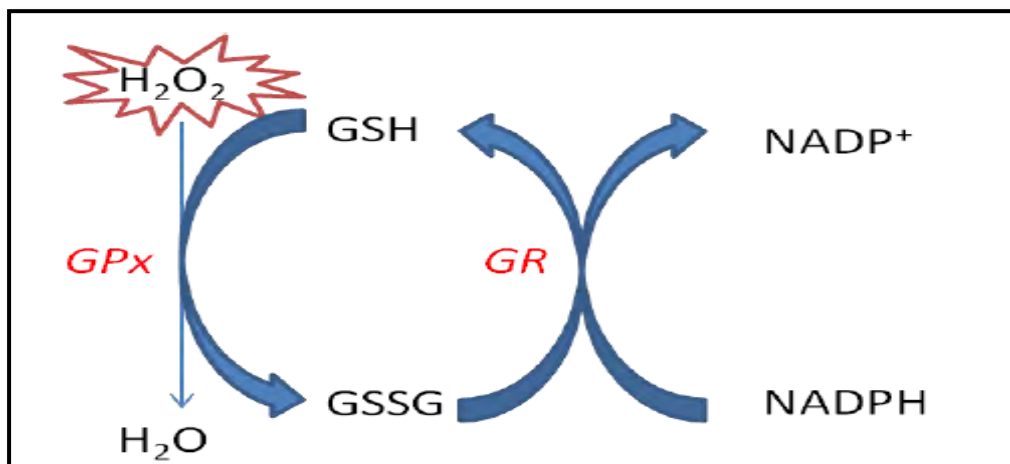


La figure ci-dessus représente la structure tétramérique de la GPx :



**Figure 11:**Structure de la Gpx (Lyons et al., 1990)

La glutathion réductase ou GR réduit le glutathion oxydé en utilisant le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotique phosphate ; figure 12), elle est donc nécessaire pour maintenir l'activité de GPx.

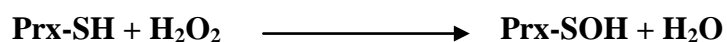


**Figure 12:** Cycle d'élimination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par le GSH. (William, 2013)

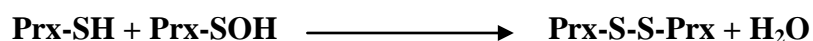
D'autres enzymes jouent également un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante. L'ensemble formant ainsi un système complexe comme les peroxyrédoxines, la thiorédoxine, la glutathion -S- transférase et l'hème oxygénase (Machlin et al., 1987).

- *Les peroxyrédoxines et la thiorédoxine*

Les peroxyrédoxines (Prx) forment une famille de peroxydases à groupement thiol capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et d'autres peroxydes. Elles ont en commun de posséder un résidu cystéine à leur extrémité N terminale qui va être le site primitif d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène:



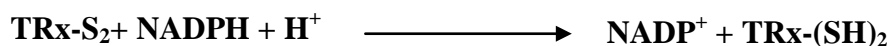
La Prx oxydée réagit alors avec une autre molécule de PRx-SH pour former un pont disulfide:



Le dimère disulfide est finalement régénéré en PRx réduite en oxydant une molécule contenant deux groupements thiols adjacents, la thiorédoxine (TRx) :



Les deux groupements thiols de la TRx forment alors un pont disulfide qui est réduit par la thiorédoxine réductase en utilisant comme donneur d'électrons le NADPH :



Il existe six isoformes de PRx localisés principalement dans le cytoplasme et la mitochondrie. Leur activité catalytique est plus faible que celle de la catalase ou des GPx mais elles possèdent une forte affinité avec le peroxyde d'hydrogène. Les PRx pourraient ainsi être plus efficaces pour éliminer des niveaux faibles de peroxyde d'hydrogène (Rhee et al., 2005).

- ***La glutathion S-transférase (GST)***

La GST est une famille d'enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka al., 2003). La GST est un système très important dans la protection de la cellule contre les ERO par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réaction des peroxydes (Zhihua et al., 2004).

- ***L'hème oxygénase***

Le système (HO) est constitué de trois iso enzymes : la forme HO-1 inductible, la forme HO-2 constitutive et la forme HO-3 qui a été récemment clonée. L'effet Protecteur de la HO contre le stress oxydant est indirect, puisqu'il est relié au fait que :

- La biliverdine se transforme en bilirubine à activité antioxydante (Ryter et Tyrell, 2000).
- Le fer produit par l'activité de l'HO stimule la synthèse de la ferritine, qui est également impliquée dans la réponse antioxydante (Milane, 2004).

### **3.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques**

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont naturellement présents dans les végétaux et les aliments ou incorporées à ceux-ci lors de leur fabrication.

Ils sont définis comme étant des substances qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, protéger les cellules contre les réactions d'oxydations provoquées par les radicaux libres soit par la neutralisation de ces radicaux libres et les rendent

ainsi inoffensifs, soit par l'élimination des composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation.

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

### 3.2.1. Antioxydants non enzymatiques endogènes

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

- *Le Glutathion (GSH)*

Le glutathion ou gamma-L-glutamyl-L-cystéine est souvent considéré comme le principal antioxydant non enzymatique intracellulaire (Valko, 2011). Le glutathion est impliqué dans l'inactivation des espèces oxygénées actives, ainsi que dans la régénération de certains composés aux propriétés antioxydantes, comme la vitamine E.

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.13), 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 disulfure (GSSG) (Tessier et al., 1995).

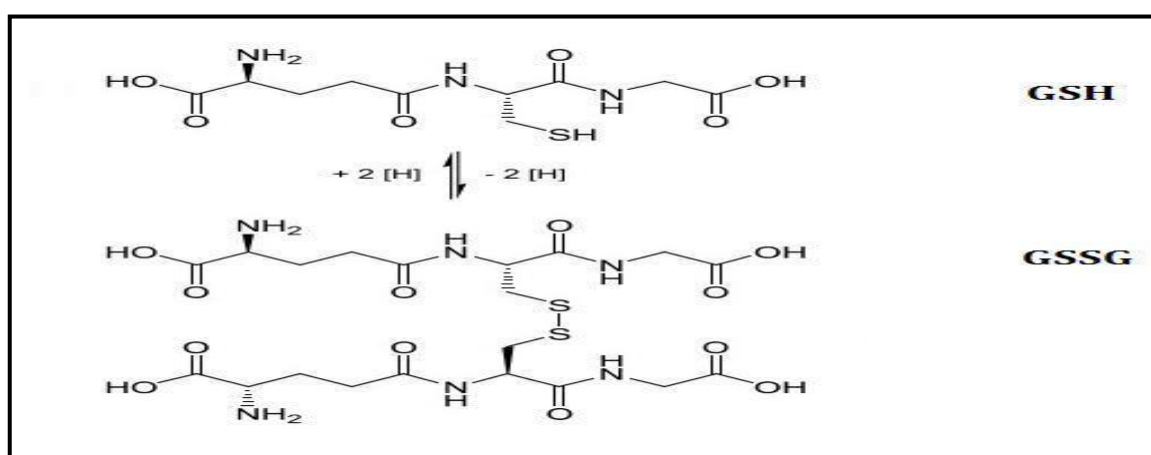


Figure 13: États d'oxydation du glutathion (Raman et Berry, 2011)



Les cellules de mammifères contiennent des concentrations millimolaires de GSH, alors que la fraction oxydée (GSSG) est deux à trois fois moins importante. Le GSH constitue le plus important groupement thiol, non protéique, des systèmes vivants. Ainsi, le GSH pourrait agir comme pro-oxydant à cause de son pouvoir réducteur vis-à-vis du fer (Tessier et al., 1995).

- ***L'Acide urique***

Issu du catabolisme des purines, l'acide urique joue un rôle important dans le système antioxydant. Il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus réactif avec les ROS, contribuant à lui seul à 60 % de la capacité antioxydante du plasma grâce à sa concentration élevée (Zhao et al., 2009).

L'acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres : il réduit les radicaux peroxydes, hydroxydes et neutralise aussi l'anion superoxyde (Ames et al., 1981 ; Simic et Jovanovic, 1989).

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 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 stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau.

La bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes  $RO_2^{\bullet}$  et protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Neuzil et al., 1993).

- ***La Coenzyme Q10***

La coenzyme Q10, forme prédominante d'ubiquinone chez l'homme et l'animal, peut agir comme un antioxydant liposoluble, en complément de son rôle dans le métabolisme

énergétique. Sa fonction serait de stimuler un recyclage efficace de la vitamine E, plutôt que d'agir directement sur les R<sup>•</sup> (Tessier et al., 1995).

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).

- ***Le Cytochrome c***

Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H<sub>2</sub>O (Skulachev, 1998).

- ***La Carnosine***

La carnosine est un dipeptide de l'histidine, présente dans de nombreux tissus chez les mammifères comme le muscle, le cerveau, le cœur, la peau et le foie.

Les teneurs en carnosine sont plus élevées dans les muscles squelettiques. Ils peuvent varier selon l'espèce animale (Purchas et al., 2004), l'alimentation (Chan et Decker, 1994) et le typage des muscles. Le taux est plus important dans les muscles squelettiques de métabolisme glycolytiques ( $\alpha$ -white) (Aristoy et Toldra, 1998). En effet, grâce à son pouvoir tampon, elle peut neutraliser la production d'acide lactique dans les muscles où la glycolyse anaérobie est particulièrement active (Suzuki et al., 2006).

Ce peptide possède des propriétés antioxydantes qui protègent l'organisme contre l'action des radicaux libres (Velez et al., 2008) :

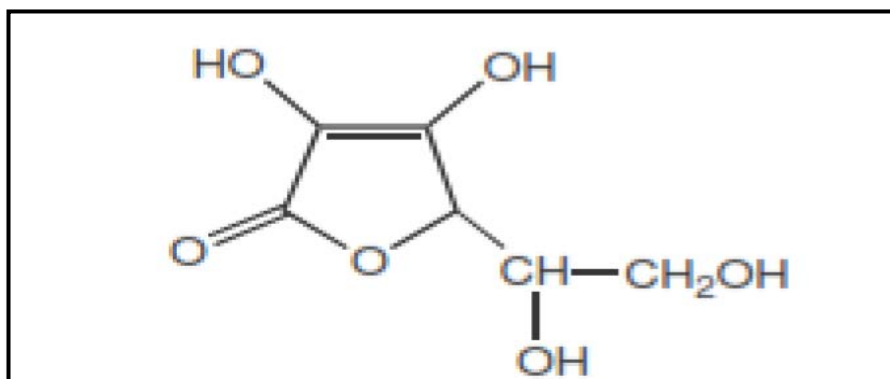
- ✓ chélatant les métaux de transitions (fer, cuivre, zinc, cobalt) ;
- ✓ piégeant les radicaux libres centrés sur l'oxygène.

### **3.2.2. Antioxydants non enzymatiques exogènes**

En outre, le système oxydant du corps humain comprend des molécules exogènes, c'est-à-dire apportées par l'alimentation, telle que la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes.

- *La Vitamine C*

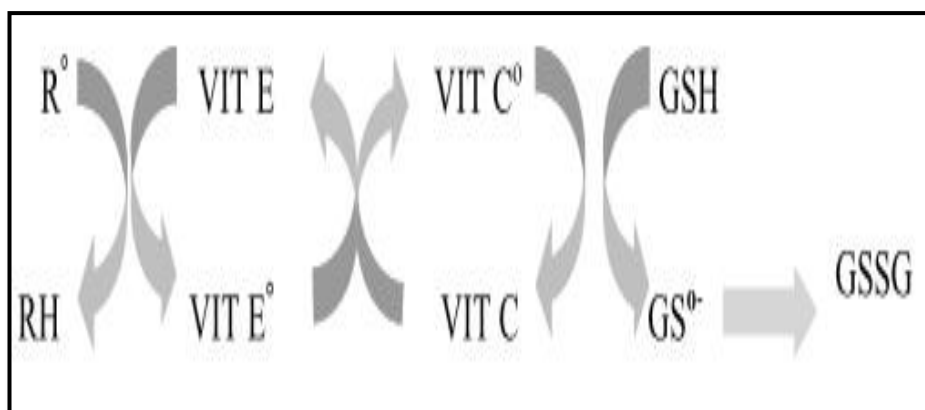
La vitamine C (fig.14) est un nutriment essentiel qui doit être apporté par l'alimentation. Elle tient son nom "acide ascorbique" de la maladie scorbut qui touche les personnes privées de fruits et légumes pendant une longue période. Elle est caractérisée par son puissant potentiel réducteur (klimczak et al., 2007).



**Figure 14:**Structure de l'acide ascorbique (Diallo, 2005)

L'acide ascorbique est un antioxydant par excellence, il permet de capter les radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet-}$ , l'oxygène singulet, les espèces réactives d'azote (peroxynitrite, nitrogène dioxyde, le radicale nitroxyde) et les radicaux hydroxyles ( $\bullet OH$ ), grâce à son rôle de donneur d'électrons (potentiel redox élevé) pour donner un radical ascorbyl relativement stable. Il est doté également d'une grande capacité de régénération par des réducteurs intracellulaires (glutathion,  $NAD^+$  et  $NADP^+$ ) (Northrop-Clewes et Thurnham, 2007).

En outre, la vitamine C permet de régénérer la forme non radicalaire de la vitamine E. (fig.15). La forme radicalaire de la vitamine E ( $VTE^{\bullet}$ ) résulte de l'interaction entre la vitamine E et un radicale lipidique ( $R^{\bullet}$ ). La vitamine C permet de régénérer la vitamine E ( $VTE$ ) puis, à son tour se transforme en forme radicalaire ( $VTC^{\bullet}$ ).



**Figure 15:**Régénération de la vitamine E par la vitamine C (Bossokpi, 2002).

La régénération de la vitamine C se fait par l'intermédiaire de la forme réduite de glutathion (GSH). L'accumulation de deux radicaux thyles ( $GS^{\bullet}$ ) donne du glutathion oxydé (GSSG) (Bossokpi, 2002).

L'acide ascorbique contribue également au maintien des défenses naturelles de l'organisme, aide à activer la cicatrisation, à la formation des globules rouges et favorise également l'absorption du fer contenu dans les végétaux (Valko et al., 2006).

- ***La Vitamine E***

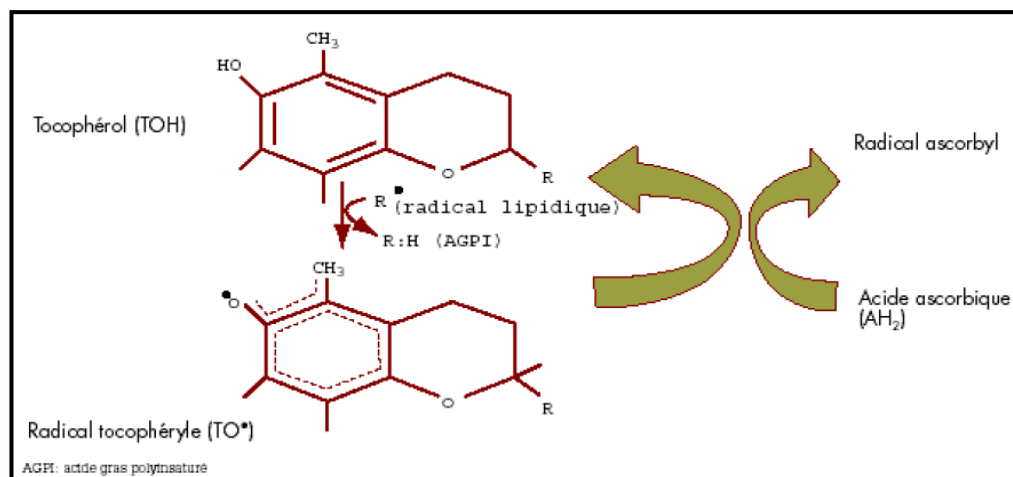
La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identique à celles de la famille des tocophérols. Sa forme naturelle inclut quatre tocophérols isomères ( $\alpha$ , B,  $\gamma$  et  $\delta$ ) avec une activité antioxydante variable (Carr et al., 2000).

Elle est présente dans les huiles végétales, principalement dans l'huile de germe de blé, de tournesol, de soja, d'arachide ou d'olive. Elle se trouve aussi en moindre quantité dans les céréales, les amandes, les légumes verts, le beurre, la margarine et les poissons gras (Lopez et al., 2005).

La vitamine E ( $\alpha$ -TOH), est l'antioxydant lipophile majeur (Barus, 2008). Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles. Elle est ainsi capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical hydroxyle et forme le radical tocophéryle (Brigelius-Flohe et Traber, 1999).

L' $\alpha$ -TOH est le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque particule LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules d' $\alpha$ -TOH. Ce dernier est incorporé dans les particules de LDL au cours de leur métabolisme, grâce à une protéine appelée protéine de transfert de l' $\alpha$ -TOH (ou  $\alpha$ -tocophérol transfer protein).

Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' $\alpha$ -TOH, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical  $RO_2^{\bullet}$ , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Lopez et al., 2005). En cédant son hydrogène, l' $\alpha$ -TOH se transforme lui-même en produit radicalaire mais de faible réactivité, qui à son tour régénéré (fig.16) par la vitamine C (Defraigne et al., 2007).



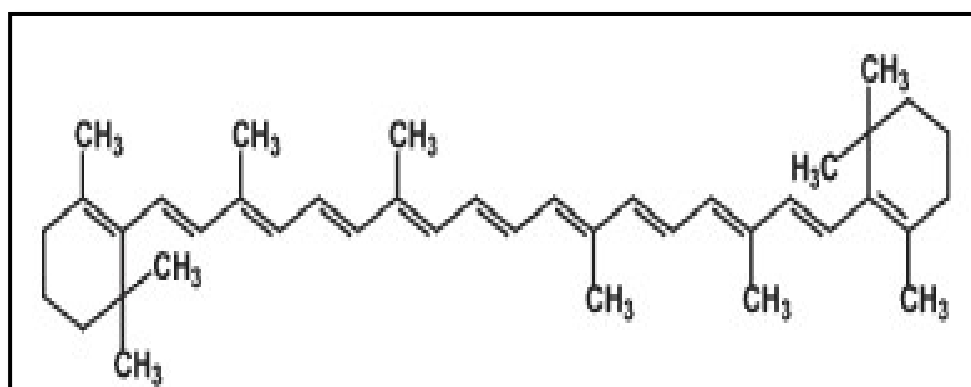
**Figure 16:** Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique (Defraigne et al., 2007)

L'  $\alpha$ -TOH peut réagir directement avec le radical initiateur, tel que le radical  $\cdot\text{OH}$ , inhibant ainsi la formation du radical  $\text{RO}_2\cdot$ . La réaction de la vitamine E avec l'anion  $\text{O}_2\cdot^-$  est très lente et par conséquent peu probable.

L'  $\alpha$ -TOH peut aussi réguler les enzymes antioxydantes telles que la SOD, la GPx, la CAT du foie, la GST et la NADPH réductase.

- **La Vitamine A (famille des caroténoïdes)**

Les caroténoïdes sont notamment connus pour être des pigments rouges et oranges de nombreux fruits et légumes. Parmi les 600 caroténoïdes identifiés, 50 d'entre eux sont reconnus pour être des précurseurs de la vitamine A, le plus connu étant le B-carotène (fig.17) :



**Figure 17 :** Structure du  $\beta$ -carotène (Flora et al., 2008)

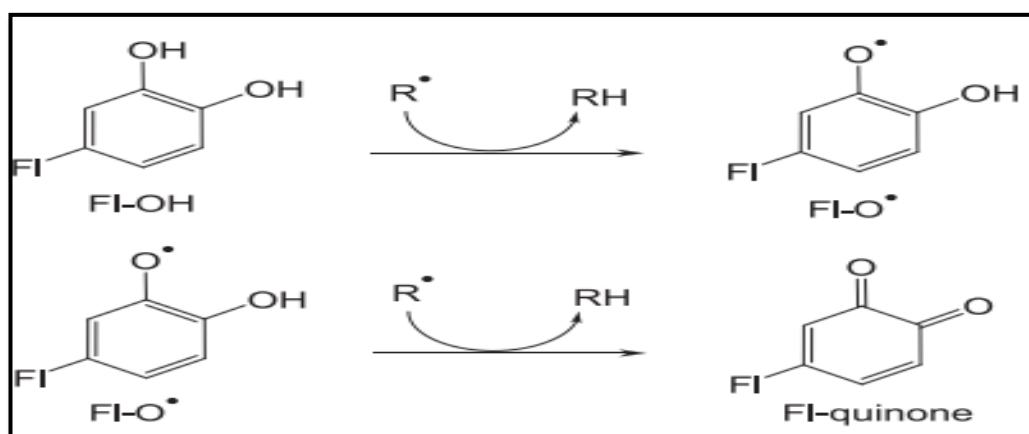
Les caroténoïdes piègent les molécules d'oxygène singulet (Stahl et Sies, 2002), formées par les radiations solaires. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont également de bons piègeurs de radicaux peroxylessus de l'oxydation des lipides (Stahl et Sies, 1997), empêchant ainsi les dommages causés par l'oxydation des membranes cellulaires (Mirkhalaf et al., 2011).

- **Les Flavonoïdes**

Les composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une très grande diversité dont les flavonoïdes font partie.

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. Ce groupe de composés est, en effet, défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement C6-C3-C6 (Di Carlo et al., 1999).

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante où ils sont capables de piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ), anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et les radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



**Figure 18** : Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leurs groupements hydroxyles fortement réactifs. chaque groupe O-H sert, en fait, de donneur d'hydrogène.

Ils sont également doués d'une activité chélatrice en vers les ions métalliques (notamment libérés par les protéines de fixation ou de transport endogènes) et leur capacité à piéger les radicaux libres sont nettement supérieures à celles des vitamines (Heim et al., 2002).

- *Les Oligoéléments*

Le terme oligoélément vient du grec « oligos » signifiant « petit » ou « peu abondant ». Effectivement, les oligoéléments sont des éléments chimiques présents dans le corps humain en concentration inférieure à 0.01%. Ce sont des éléments qui doivent être apportés par l'alimentation.

Les oligoéléments antioxydants sont des micronutriments qui sont fortement impliqués dans l'homéostasie énergétique. Ce sont des cofacteurs indispensables pour des réactions métaboliques d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Il s'agit principalement du cuivre, du manganèse, du sélénium et du zinc :

- ❖ **Le Cuivre (Cu)**

Le cuivre (Cu) d'origine alimentaire est absorbé au niveau digestif par l'intermédiaire de protéines spécifiques. Il a un rôle essentiel au sein du corps humain et plus particulièrement du métabolisme cellulaire car il est le cofacteur de nombreuses enzymes.

Il se comporte également comme un antioxydant en stimulant la superoxyde dismutase, protégeant ainsi la cellule contre l'effet toxique des radicaux libres (Dusek et al., 2015). Néanmoins, une augmentation excessive de cuivre conduit à une production de HO<sup>•</sup> (Laliberte et al., 2008).

Le Cu<sup>+</sup> réagit avec le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour générer le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) (Manzl et al., 2004), un radical très réactif et qui peut causer des dommages cellulaires :



Les principales sources alimentaires de cuivre sont le foie, les crustacés, le chocolat, les noix, les céréales et les fruits. Les apports recommandés sont entre 1 et 2 mg/j chez l'adolescent et l'adulte, quel que soit le sexe (Dusek et al., 2015).

**❖ Le Zinc (Zn)**

Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant en assurant le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes (Favier, 2003). Cependant, au-delà de cette fonction, le zinc possède d'autres propriétés antioxydantes tel que l'inhibition de la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions, en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton (Chappuis et Favier, 1995).

**❖ Le Sélénium (Se)**

Le sélénium(Se) joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes (GPx) (Rollin, 2002).

Les sélénoprotéines assurent, en synergie avec d'autres molécules de nature enzymatique (superoxyde dismutase, catalase) ou non enzymatique (vitamine E, C, caroténoïdes, groupes thiols, polyphénols, coenzyme Q10) l'équilibre intra et extracellulaire de la balance pro et antioxydants (Chappuis et Favier, 1995).

**❖ Le Manganèse (Mn)**

Le manganèse est présent en grande quantité dans les mitochondries du muscle squelettique, du foie, du pancréas et du rein. Il participe à la synthèse des vitamines E et B1 (Fitsanakis et al., 2009).

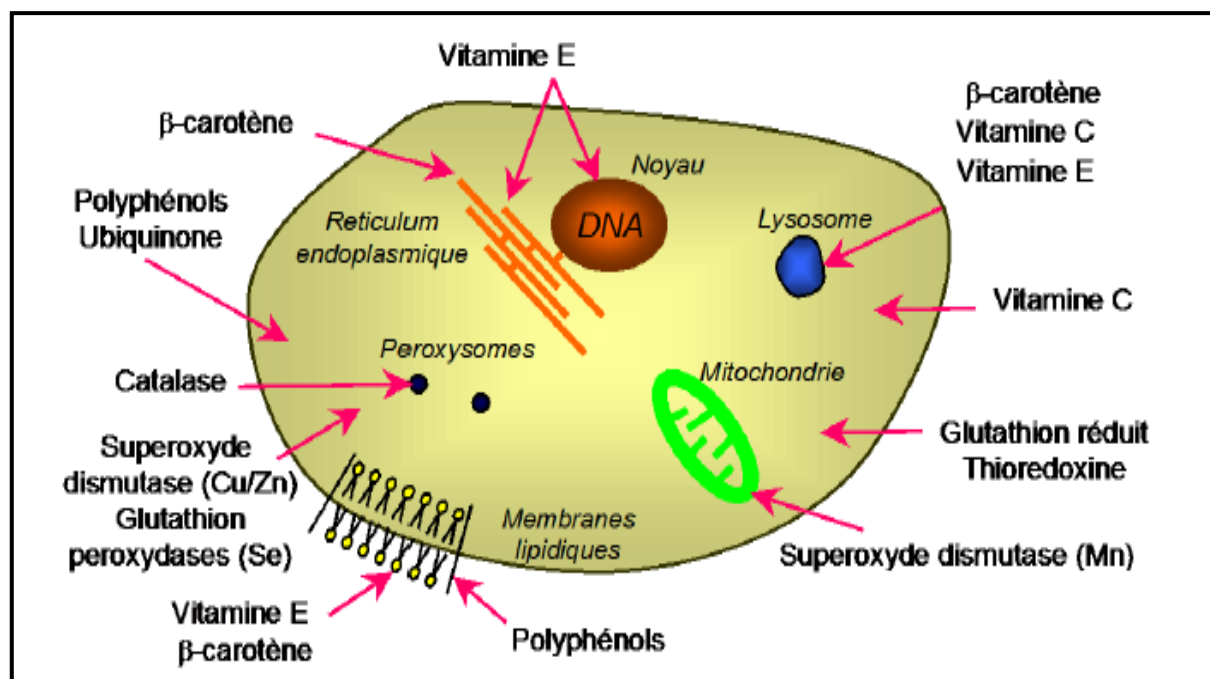
Il est retrouvé principalement dans le quinoa, le seigle, le riz complet, le soja, l'avocat, le jaune d'œufs, les haricots verts, les épinards, le thé vert, les huitres, l'huile d'olive et les noix. Un déficit ou une diminution de la biodisponibilité du manganèse dans les tissus riches en mitochondries, conduit à une inactivation de la SOD-Mn, ce qui peut augmenter le stress oxydant (Chen et al., 2015).

**❖ Les Protéines antioxydantes**

La transferrine, la ferritine et la céruléoplasmine jouent un rôle antioxydant par chélation des ions (Curtay et Robin, 2000; Pincemail et al., 2002). Ces chélateurs forment des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Ils inhibent ainsi le cycle redox du métal ont construits des complexes métalliques insolubles (Cillard et Cillard, 2006).



Les deux types de protections antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants sont présentés dans la figure suivante (Fig.19) :



**Figure 19** : Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (Machlin et al., 1987)

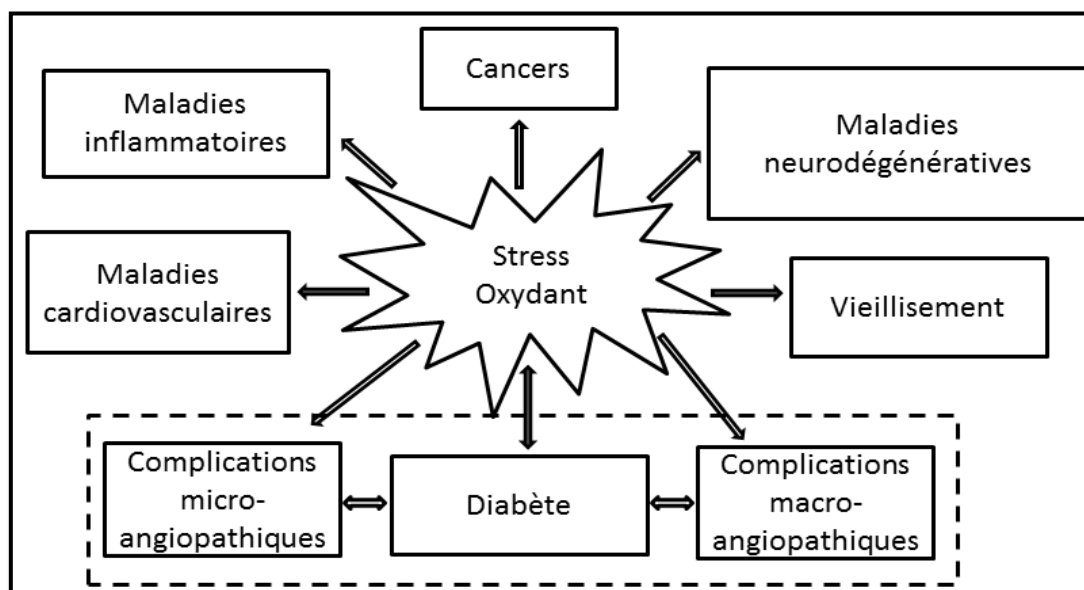
Cependant, si cette protection est insuffisante, le stress oxydant touche donc l'ensemble des tissus et des métabolismes et il sera de ce fait la cause initiale essentielle de plusieurs pathologies. Dans le chapitre suivant, nous donnons quelques exemples des maladies associées au stress oxydatif et les risques de complications.

CHAPITRE III.  
MALADIES LIEES AU STRESS  
OXYDANT

### III. Stress oxydant et pathologies

#### 1. Exemples des maladies liées au SO

Le SO est impliqué dans de très nombreuses maladies (fig.20) 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.



**Figure 20 :** La place centrale du stress oxydant au sein des pathologies

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 (Favier, 2003). Ainsi, les conséquences du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire.

En fait, de légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane entraînant des lyses immédiates. D'autres perturbations biologiques sont observées à la suite d'un stress oxydant : baisse de la fluidité des membranes, anomalies de récepteurs, diminution de la

sensibilité à l'insuline, perturbation de l'immunité cellulaire, fibrose, dépôts de lipides, affaiblissement musculaire, voire mort neuronale ou apparition de mutations.

De ce fait, le stress oxydant sera la cause initiale essentielle de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse pulmonaire aigu, œdème pulmonaire et vieillissement (Favier, 2006).

### 1.1. Diabète de type 2

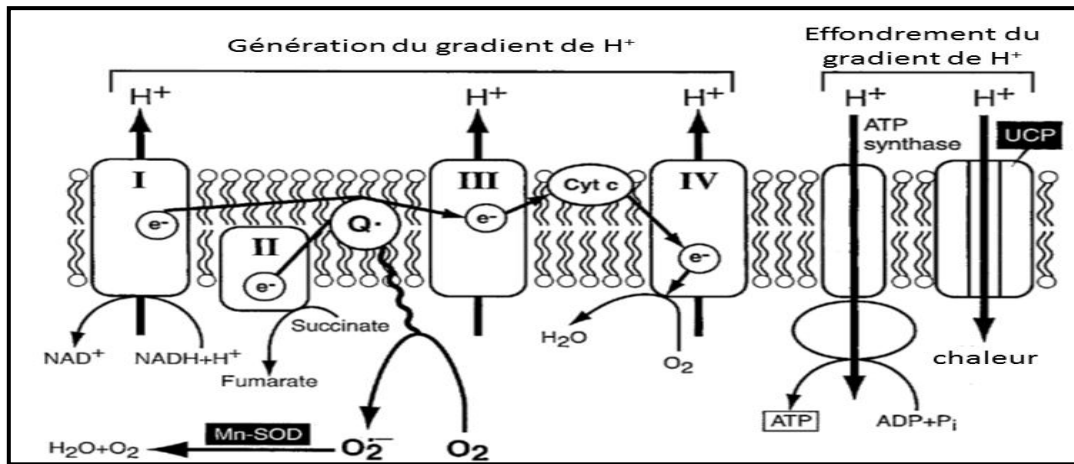
Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant se caractérise notamment par une hyperglycémie chronique liée à une diminution de l'absorption du glucose au niveau des tissus adipeux et musculaire (Valko et al., 2007).

De manière générale, le diabète implique des dérèglements du métabolisme. Or, la plupart des voies métaboliques annexes activées dans la pathologie du diabète sont accompagnées par une surproduction d'espèces oxydantes hautement réactives, mises en cause dans l'apparition des diverses complications. Les causes des complications et des pathologies associées au diabète sont d'une part des mécanismes directement oxydatifs du fait de l'état de stress oxydant chronique altérant les molécules biologiques, mais sont également les voies délétères pour les cellules activées par les ROS (Nishikawa et al., 2000) :

#### ✓ Production de ROS par la chaîne respiratoire

Au niveau de la chaîne respiratoire, les métabolites issus du cycle de Krebs fournissent les électrons nécessaires au fonctionnement des pompes à protons permettant la mise en place d'un potentiel membranaire utilisé pour la synthèse d'ATP. Le transfert de ces électrons est assuré par les différents complexes au sein de la membrane mitochondriale interne. En cas d'hyperglycémie, l'oxydation du glucose est augmentée, provoquant la croissance du potentiel membranaire qui lorsqu'il atteint un seuil critique, bloque le transfert d' $e^-$  au niveau du complexe III. Les  $e^-$  non appariés échappent alors de l'ubiquinone pour produire l'anion superoxyde en réagissant avec l'accepteur final, l' $O_2$  (Brownlee, 2001).

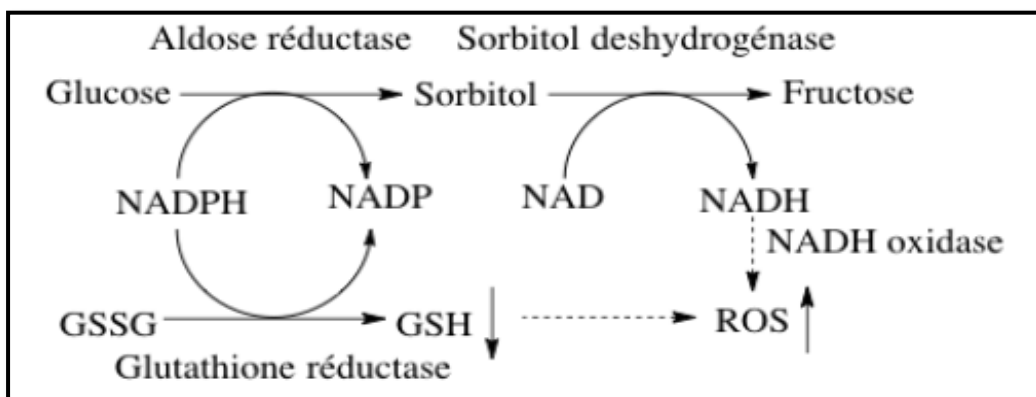
Dans les axones, la forte population de mitochondries et un accès direct au glucose peut expliquer l'apparition d'un stress oxydant en cas d'hyperglycémie. Ce stress peut provoquer la mitoptose à travers des dommages de l'ADN mitochondriale, et peut évoluer jusqu'à la mort cellulaire programmé à l'origine des neuropathies (Figuerola-Romero et al., 2008).



**Figure 21 :** Production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Amplification de la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire induite par une entrée massive de glucose dans la cellule suivant un épisode hyperglycémique) (Brownlee, 2005)

✓ **La voie des polyols**

Dans les conditions d’hyperglycémie, on observe une augmentation de la conversion enzymatique du glucose en sorbitol par l’aldose réductase. Dans des conditions physiologiques, cette réaction a également lieu, mais due à la faible affinité de l’enzyme pour son substrat et cette voie reste limitée (Defraigne, 2005). Ensuite, le sorbitol déshydrogénase (SDH) prend le relais en générant du fructose. Les activités enzymatiques de cette voie affaiblissent d’une part les défenses anti-oxydantes par la consommation du NADPH nécessaire à la régénération du GSH, et stimulent d’autre part la production indirecte de ROS par la NADH oxydase liée à l’accumulation de NADH (fig.22). Un stress oxydant apparait donc suite à l’affaiblissement des défenses anti-oxydantes et une surproduction des entités réactives (Baynes et Thorpe, 1999; Brownlee, 2001).

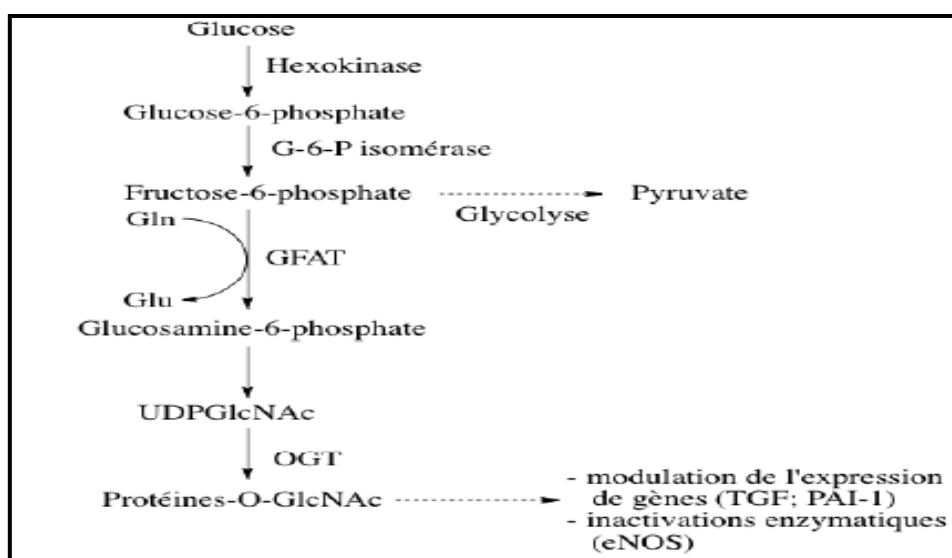


**Figure 22 :** Voie des polyols (Martin et Hwa, 2012)

✓ **La voie des hexosamines**

Une partie du glucose intracellulaire peut également être détournée de la glycolyse au profit de la voie des hexosamines. Cette voie, à travers la baisse de l'activité glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et l'activation de la glutamine:fructose-6 phosphateaminotransférase (GFAT), est à l'origine de l'O-acétylglucosaminylation des protéines(Fig.23). Ceci peut résulter en la perte de leur fonction (Brownlee, 2001; Du et al.,2000).

Par exemple, dans les cellules endothéliales, lorsque l'eNOS est concernée, elle est inactivée, ce qui entraîne une altération de la fonction endothéliale. De plus, l'augmentation des taux cytoplasmiques de glucosamine génère la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ainsi, l'hyperglycémie conduit notamment à une perte de fonctionnalité des cellules β-pancréatiques, à travers ce mécanisme d'activation de la voie des hexosamines, productrice de ROS (Kaneto et al., 2001).



**Figure 23 :** Voie des hexosamines (Lima et al., 2012)

✓ **La voie des protéines kinase C**

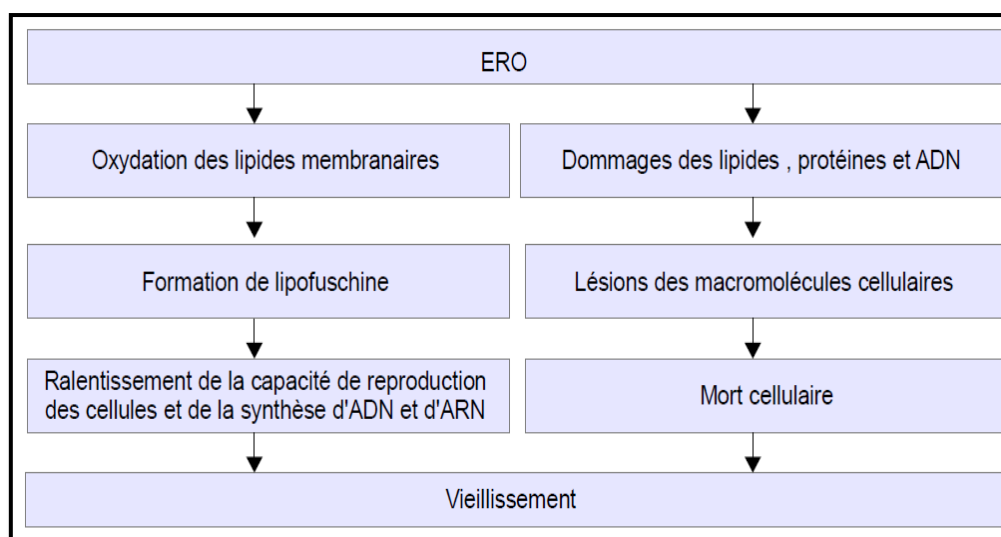
L'hyperglycémie induit là encore la synthèse de diacylglycérol (DAG) soit à partir des métabolites intermédiaires de la glycolyse, soit indirectement par la production de ROS stimulant à leur tour la production de DAG (Das Evcimen et King, 2007). L'accumulation de DAG initie l'activation de la voie des protéines kinases C (PKC). D'une part, les PKC génèrent une surproduction d'anion superoxyde (Ceriello, 2003; King et Loeken, 2004).

D'autre part, les PKC vont agir sur diverses voies de signalisation impliquées dans plusieurs complications diabétiques. Parmi celles-ci, les PKC réduisent l'expression d'eNOS dans les cellules endothéliales induite par l'insuline mise en cause de la dysfonction endothéliale. (Defraigne, 2005).

## 1.2. Vieillesse

Le vieillissement est l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques qui modifient, après la phase de maturité, la structure et les fonctions de l'organisme d'un être vivant sous l'action du temps. La notion de physiologie exclut les modifications induites par des maladies. Il a pour caractéristiques d'être progressif, universel et classiquement inéluctable et irréversible (De Jaeger, 2011).

Il existe de nombreuses théories explicatives de ce phénomène de vieillissement : théorie génétique, théorie immunologique, théorie de la restriction calorique et théorie du SO (Fig.24). Cette dernière attribue un rôle prépondérant aux ERO qui entraînent des lésions macromoléculaires de la cellule, en réagissant avec les lipides notamment membranaires, les protéines et les acides nucléiques, ce qui peut entraîner des dégâts majeurs de la cellule pouvant conduire à la mort cellulaire (Harman, 1956).



**Figure 24 :** L'interaction du stress oxydant avec le vieillissement

Les ERO provoquent des attaques des cibles cellulaires, induisant des dommages oxydatifs moléculaires cumulatifs responsables du vieillissement. L'accumulation de produits d'oxydation des biomolécules au niveau plasmatique et au niveau cellulaire, est responsable

de dégâts organiques. Les RL attaquent notamment les membranes de nos cellules qui sont très vulnérables à l'oxydation puisqu'elles sont constituées de lipides insaturés. L'oxydation des membranes produit un déchet métabolique, la lipofuscine, qui par accumulation dans l'organisme apparaît sur la peau en formant ce que l'on nomme les « tâches de vieillesse ». La lipofuscine ralentit la capacité de reproduction des cellules et la synthèse de l'ADN et de l'ARN (De Jaeger, 2011).

### 1.3. L'obésité

D'un point de vue médical, l'obésité est un excès de masse grasse entraînant des inconvénients pour la santé.

Chez les sujets obèses, un état de SO a été mis en évidence. Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été évoquées pour tenter d'expliquer comment le SO est susceptible de participer à la pathogenèse de l'obésité, mais cette dernière elle-même pourrait être responsable de l'induction d'un état de SO. Le SO est donc à la fois induit par l'obésité, mais il favorise aussi l'accumulation des graisses, ce qui crée un cercle vicieux (Bonnefont-Rousselot D, 2014).

Le SO peut ainsi stimuler la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (fig.25). Au cours de l'obésité, l'accumulation excessive de lipides stimule le développement du tissu adipeux en activant la prolifération des pré-adipocytes, leur différenciation en adipocytes et en augmentant la taille des adipocytes (Spiegelman et Flier, 2001).

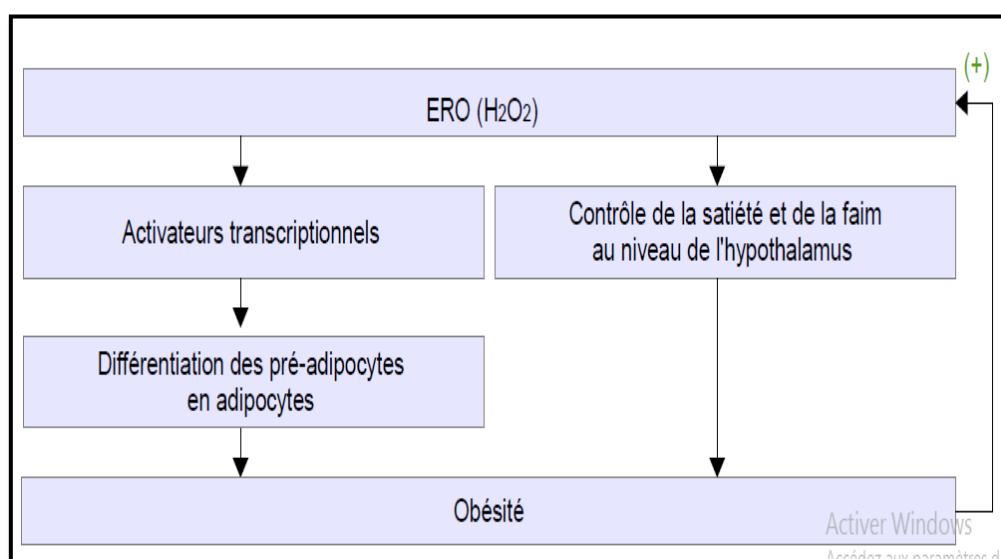


Figure 25 : L'interaction du stress oxydant avec l'obésité



Or, il a été montré que le SO induit par  $H_2O_2$  favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, en régulant positivement des activateurs transcriptionnels tels que le C/EBP- $\beta$  et le PPAR- $\gamma$ , intervenant dans le programme de différenciation adipocytaire (Lee et al., 2009).

En outre, des données attribuent également aux ERO un rôle dans le contrôle du poids par le système nerveux central (Alfadda et Sallam, 2012). Plus spécifiquement, elles pourraient agir au niveau de l'hypothalamus, zone où sont localisés de nombreux neurones permettant le contrôle de la satiété ou de la faim. Ces données permettraient de mieux comprendre la difficulté de perte de poids avec l'âge ainsi que la longévité induite par la restriction calorique. Parallèlement, l'obésité peut induire un état de SO au niveau adipocytaire (Wellen et Thompson, 2010).

#### 1.4. Cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle causée par des facteurs internes comme les mutations héréditaires, les hormones et les conditions immunitaires ; et des facteurs environnementaux acquis comme le tabac, l'alimentation, les rayonnements et les agents infectieux. Ces facteurs modulent certains éléments cellulaires importants incluant des gènes tels que proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN à travers des intermédiaires cellulaires (Storz et al., 2013).

Les intermédiaires cellulaires influencent les voies de signalisation cellulaire, qui sont principalement médiées par les facteurs de transcription suivants: NF- $\kappa$ B, les kinases, divers facteurs de croissance, les cytokines et d'autres protéines. Un des principaux intermédiaires cellulaires sont les ERO, qui présentent des effets bénéfiques à des niveaux faibles (signalisation intracellulaire et homéostasie), tandis que l'accumulation excessive des ERO, peut provoquer plusieurs troubles, y compris la carcinogenèse (Acharya et al., 2010).

Un niveau élevé des ERO dans n'importe quelle cellule normale peut la convertir en une cellule maligne et joue ainsi un rôle important dans les différentes étapes du cancer. Le développement du cancer par les ERO implique diverses molécules de signalisation. Les ERO, générés de façon exogène ou endogène, vont d'abord contrecarrer les mécanismes de défenses antioxydantes et induisent des lésions de l'ADN. L'accumulation des dommages d'ADN causés par un mauvais entretien ou une réparation incomplète peuvent entraîner une

mutagenèse et par conséquent une transformation, en particulier si elle est combinée avec une déficience de la voie apoptotique (Kryston et al., 2011). Si les cellules hébergeant de telles modifications de l'ADN échappent à la mort cellulaire programmée, ils peuvent continuer à proliférer, augmentant la probabilité d'une croissance cancéreuse.

Ainsi, l'oxydation des protéines par les ERO peut altérer leur fonction, y compris l'inactivation ou l'activation constitutive, ce qui peut contribuer à la croissance oncogène (Nakashima et al., 2002). Enfin, la peroxydation lipidique génère plusieurs molécules génotoxiques telles que des aldéhydes réactifs qui peuvent modifier les protéines et l'ADN (Storz et al., 2013).

### 1.5. Maladie de Parkinson

La MP est une maladie neurodégénérative caractérisée par une détérioration des cellules qui produisent la dopamine.

Le SO est potentiellement impliqué dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN) (Desport, 2002). Ces neurones sont exposés à de grandes quantités de RL oxygénés, dont l'origine peut être diverse. Une partie de la production de RL peut provenir du catabolisme de la dopamine. Celui-ci s'effectue selon deux voies principales : une dégradation non enzymatique, dite d'auto-oxydation et une dégradation par oxydation.

La dégradation par auto-oxydation produit des semiquinones puis, par polymérisation, de la neuromélanine qui génère des RL (Graham et al., 1978). La neuromélanine a une forte affinité pour le fer (Ben-Shachar et al., 1990) et possède des propriétés oxydoréductrices propres (transformation de l'oxygène en  $H_2O_2$ ) et une activité qui augmente la dismutation de l'anion  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  (Swartz et al., 1992). La dégradation par oxydation utilise la monoamine oxydase (MAO) et produit également de l' $H_2O_2$  (Spina et al., 1989). Une autre source de RL est constituée par la CRM des neurones dopaminergiques.

Enfin, la SN est une des régions cérébrales les plus riches en fer, qui peut favoriser la formation de RL à partir du  $H_2O_2$  par la réaction de Fenton (Sofic et al., 1991). Il est donc théoriquement possible qu'un dysfonctionnement d'un de ces systèmes producteurs de RL puisse conduire à un SO et favorise la destruction des neurones dopaminergiques au cours de la MP.

### 1.6. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique multifactorielle qui se caractérise par un épaissement de la paroi des artères au niveau de l'intima (fig.26). Les LDL circulantes vont pénétrer par transcytose dans l'intima où elles vont être oxydées par les EROs. Les LDL oxydées vont ensuite stimuler au niveau des cellules endothéliales la production de molécules VCAM, ICAM, MCP-1, entraînant le recrutement de monocytes qui une fois dans l'intima vont se différencier en macrophages.

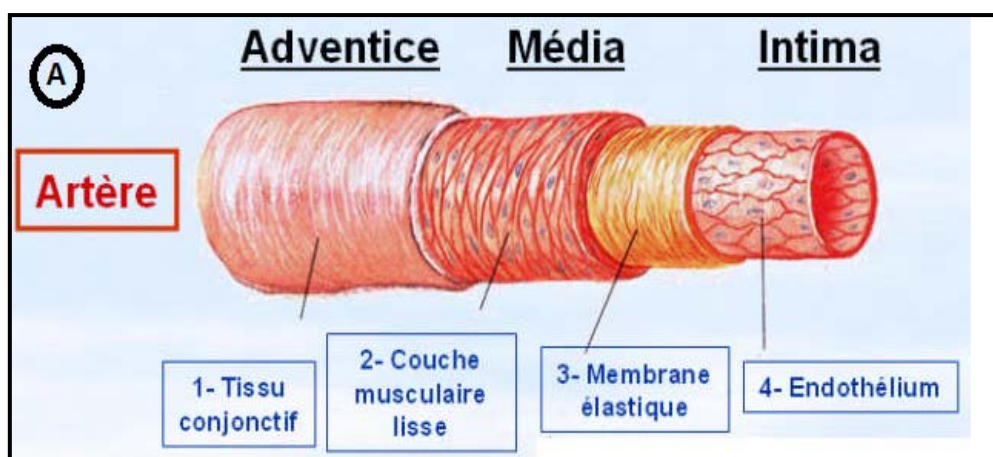


Figure 26 : Structure de la paroi artérielle (Bruneval, 2003)

Les macrophages possèdent des récepteurs qui reconnaissent les LDL oxydées. Ils vont donc être internalisés par les macrophages formant ainsi des cellules spumeuses qui aboutiront à la formation de stries lipidiques, première étape du développement de la plaque d'athérosclérose (fig.27) (Clémentine, 2014).

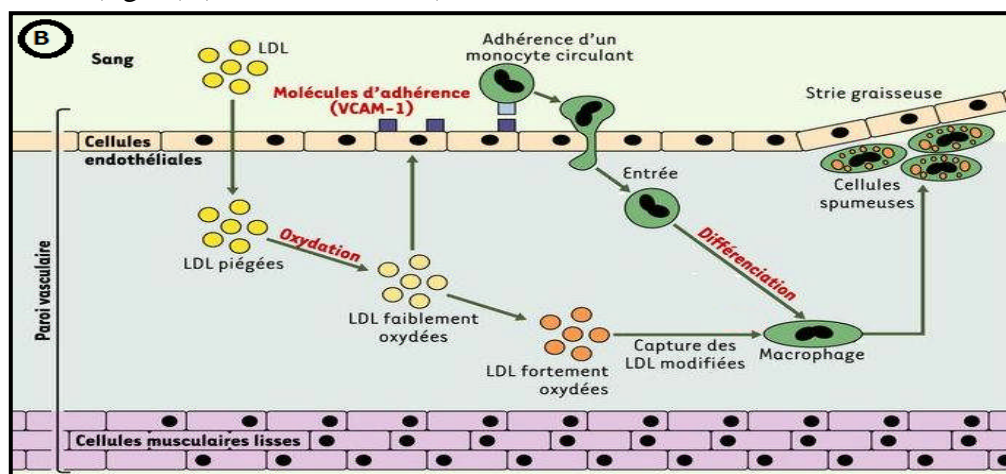


Figure 27 : la formation d'une plaque d'athérosclérose (Léoni, 2001)

CHAPITRE IV.  
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,

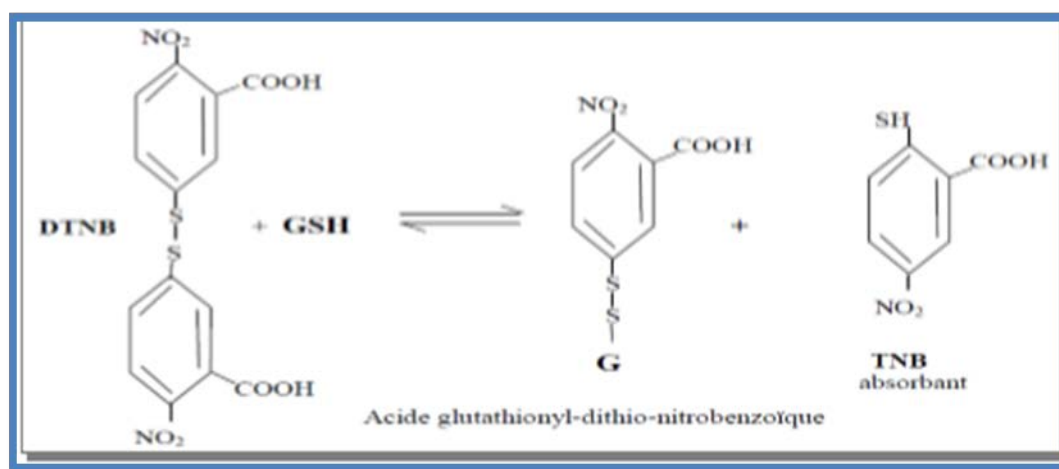
- ✓ Les dosages des biomarqueurs en fonction du matériel dont nous disposons au sein de notre établissement et les réactifs disponibles.

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 28** : 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

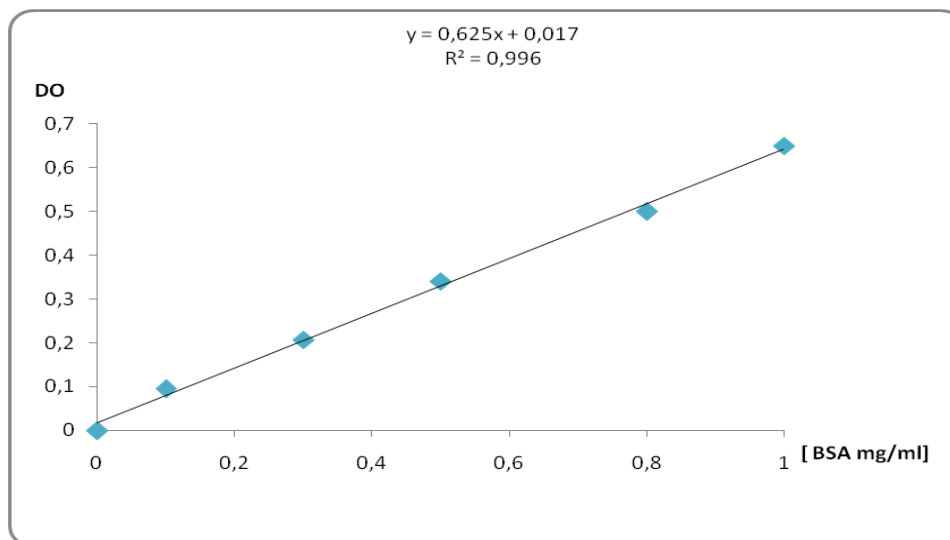
Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford (1976), qui utilise le Bleu Brillant de Coomassie et l'albumine de bœuf comme standard.

Le bleu de Coomassie réagit avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) 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.29)

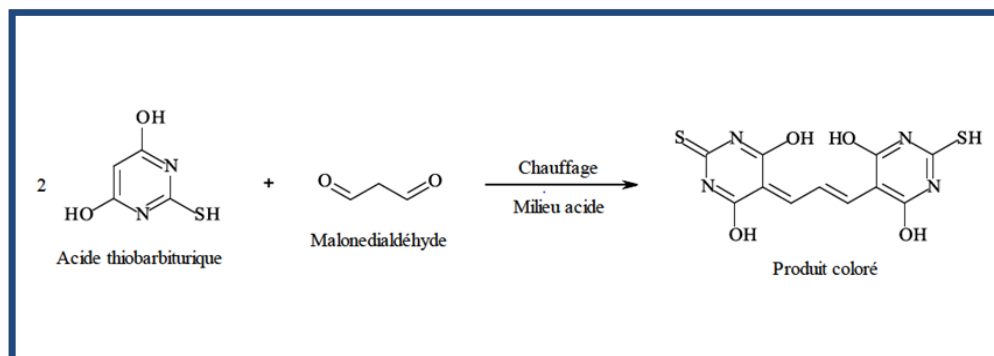


**Figure 29 :** la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1 mg/ml) pour le dosage des protéines.

## 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 30:** 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.

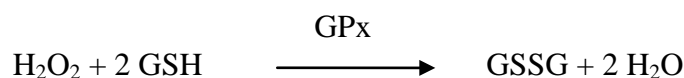
La concentration du MDA est calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = E.C.L) :

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

- 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 :

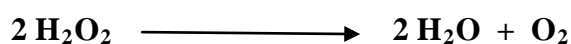
$$\text{GPx (nmol GSH/mg)} = \frac{\text{DO}_{\text{échantillon}} \times \text{DO}_{\text{étalon}} \times 0.04}{\text{DO}_{\text{étalon}}}$$

- DO<sub>échantillon</sub> : Densité optique de l'échantillon ;
- DO<sub>étalon</sub> : 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

#### 2.4.1. Mode opératoire

Réactifs	Blanc (ul)	Essai (ul)
Tampon phosphate (PBS) (0.1 M, pH 7.4)	800	780
$\text{H}_2\text{O}_2$ (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  $\mu\text{L}$  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 :

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

- $\Delta\text{DO}$  : Variation de la densité optique par minutes ;
- $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,04  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ );

- L : Largeur de la cuve ou longueur du trajet optique (1 cm);
- X : Quantité des protéines en mg/ml;
- Fd : Facteur de dilution du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon (0,02).

# DISCUSSION D'ÉTUDES

## II. DISCUSSION

Mettre en évidence un lien entre l'occurrence de certaines maladies et le stress oxydatif est un domaine d'étude qui retient l'attention de nombreux chercheurs.

Certes, l'origine de la plupart des états pathologiques est multifactorielle, mais la possibilité d'influencer leur apparition et leur développement grâce à l'alimentation présente un grand intérêt. L'utilité de certains nutriments semble aujourd'hui reconnue. Il s'agit, en particulier de vitamines et molécules naturelles ayant une activité antioxydante, permettant de lutter contre les radicaux libres. A cause de la grande réactivité et de l'action délétère de ces derniers sur les systèmes biologiques, ils sont incriminés dans les mécanismes du vieillissement et interviennent dans la physiopathologie de plus d'une centaine de maladies. Renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme semble donc un enjeu majeur pour préserver la santé.

Dans le cadre de ce travail, nous allons essayer de donner les points de quelques études qui nous semblent essentiels à la bonne compréhension du phénomène du stress oxydatif et nous allons ainsi présenter les résultats qui se déduisent de ces études et les analyser assez brièvement :

Au travers des différentes études (Mozhdeganloo et al., 2015; Abdel Rheim et al., 2015 ; Renuka et al., 2017 ; Amraoui et al., 2018 ; Giovanella et al., 2015) menées dans le but d'évaluer expérimentalement le stress oxydant, nous avons pu voir que des polluants comme les pesticides, les métaux lourds et certains produits chimiques sont effectivement des éléments prooxydants. Ils sont donc capables de déclencher un stress oxydant.

L'étude de (Mozhdeganloo et al., 2016), a pour objet d'évaluer l'hépatotoxicité de la perméthrine (pesticide) chez le poisson (Rainbow). Les auteurs de cette étude ont montré que l'exposition des poissons à ce pesticide induit un stress oxydatif dans le foie, se traduisant par une élévation du taux de malondialdéhyde (MDA) et de la concentration du glutathion réduit (GSH). Toutefois, ces mêmes auteurs ont montré le pouvoir protecteur de la vitamine C contre l'hépatotoxicité induite par la perméthrine. L'activité hépatoprotectrice a été observée par la restauration des marqueurs du stress oxydant (MDA, GSH).

De même, l'étude de (Abdel Rheim et al., 2015) confirme également l'effet pro-oxydant des pesticides dans le foie des rats traités par l'esfenvalérate (insecticide). De modifications

dans l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT), qui sont souvent considérées comme les marqueurs les plus significatifs du stress oxydant cellulaire, ont été constatées chez les rats contaminés par l'esfenvalérate. Ainsi, une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation du taux de MDA) et une déplétion de la teneur hépatique en GSH réduit a été observées dans cette étude. Afin de prévenir l'effet toxique de l'esfenvalérate, (Abdel Rheim et al., 2015) ont abouti à des améliorations des paramètres du stress oxydant (MDA, GSH, SOD et CAT) par un traitement des rats avec le curcuma, une plante médicinale aux très grands pouvoirs antioxydants.

D'autres travaux, ont été aussi réalisés pour évaluer l'effet pro-oxydant des métaux lourds. (Renuka et al., 2017), ont par exemple montré que, après une exposition au cadmium par voie orale, ce métal est capable d'induire des effets délétères chez le rat Wistar. Le cadmium agit via un stress oxydant (augmentation du taux de MDA), ce qui réduit le système de défense antioxydant des cellules (une diminution de l'activité de la SOD, GPx, CAT et GST). Dans cette étude, la consommation d'extraits d'*Emblica officinalis* (plante médicinale) et la quercétine (flavonoïde) a empêchée l'augmentation des niveaux de MDA et a améliorée l'activité des enzymes antioxydantes des rats traités avec le cadmium. L'*Emblica officinalis* et la quercétine ont montré une très puissante activité anti radicaux libres.

Des perturbations oxydatives (inhibition enzymatique, déplétion du glutathion et augmentation de la peroxydation lipidique), ont été observées chez des rats traités avec d'autres substances chimiques comme le bisphénol A, une substance chimique de synthèse principalement utilisée depuis de très nombreuses années dans la fabrication de plastiques et de résines. En outre, ces perturbations oxydatives sont nettement diminuées par l'administration d'antioxydants naturels (vitamine E et sélénium) (Amraoui et al., 2018).

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 *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, dirigée par Giovanella et al en 2015 a constaté que la primaquine et la chloroquine (médicaments antimalariques), 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, Giovanella et al ont montré que le traitement des rats par ces deux médicaments a provoqué une augmentation de la peroxydation lipidique rénale et des

dommages de l'ADN en particulier au niveau du foie, du cerveau et des reins ; indiquant que les effets délétères de la primaquine et la chloroquine chez les rats sont associés à un stress oxydant au niveau des organes.

Comme l'illustre la multiplicité des publications, de nombreuses études ont donc essayé d'identifier les causes du stress oxydant et d'étudier l'efficacité d'une combinaison de plusieurs antioxydants alimentaires pour renforcer le statut antioxydant et diminuer les dommages tissulaires issus des effets potentiellement nocifs des radicaux libres.



## 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. Ce processus biologique, dénommé « stress oxydant », est aujourd'hui reconnu comme principal précurseur de nombreuses pathologies telles que les cancers, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et bien d'autres encore.

Cependant, les antioxydants apportés par une alimentation saine, particulièrement riche en fruits et légumes, permettent de protéger notre organisme contre les radicaux libres et ainsi, ils permettent la prévention de nombreuses maladies. A ce titre, l'utilisation de suppléments d'antioxydants pour prévenir les situations de stress oxydant a été particulièrement étudiée.

À la suite d'une étude bibliographique sur le phénomène du stress oxydant et la capacité des antioxydants à lutter contre les effets néfastes des radicaux libres ; cette recherche documentaire que nous avons menée nous a permis 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) intensifier les recherches sur les sources d'antioxydants naturels afin d'étudier les possibilités de renforcer l'effet protecteur de l'organisme par la supplémentation de ces composés naturels;

3) confirmer l'effet protecteur des antioxydants chez l'homme ou d'autres espèces de mammifères ;

4) étudier les possibilités de renforcer l'effet protecteur par la prise concomitante de plusieurs antioxydants, suggérant ainsi une possible synergie entre ces composés naturels.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Abdel Rheim F., Abbas Ragab A., Hammam F.M., Hamdy H.E.D.** (2015). Protective Effects of Curcumin for Oxidative Stress and Histological Alterations Induced by Pyrethroid Insecticide in Albino Rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. **58** : 63-73.

**Abele D., Heise K., Pörtner H.O., Puntarelo S.** (2002). Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J Exp Biol*. **205** : 1831-41.

**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). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum*. **74** : 636-643.

**Aïra R.** (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). These de doctorat Université des Antilles et de la Guyane.

**Alfadda A.A., Sallam R.M.** (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*.

**Ames B.N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P.** (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused ageing and cancer. A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78** : 6858-6862.

**Amraoui W., Adjabi N., Bououza F., Boumendjel M., Taïbi F., Boumendjel A., Abdennour C., Messarah M.** (2018). Modulatory Role of Selenium and Vitamin E, Natural Antioxidants, against Bisphenol A-Induced Oxidative Stress in Wistar Albinos Rats. *Toxicol. Res*. **34** (3) : 231-239.

**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.

**Aristoy M.C., Toldra F.** (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. *Meat Science*. **50** (3) : 327-332.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Armstrong R.C., Swallow A.J.** (1969). Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan. *Radiat Res.* **40**: 563-579.

**Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T.** (2005). Mitochondria oxidants and aging *Cell.* **120**: 483-495.

**Barus C.** (2008). Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et environnement, Université Toulouse III - Paul Sabatier. P : 235.

**Baynes J.W. et Thorpe S.R.** (1999). «Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm.». *Diabetes.* **48** (1) : 1-9.

**Ben-Shachar D., Youdim M.B.H.** (1990). Selectivity of melanized nigro-striatal dopamine neurons to degeneration in Parkinson's disease may depend on iron-melanin interaction. *J. Neural Transm.* **29** : 251-8.

**Bisbal C., Lambert K., Avignon A.** (2010). Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **13** (4): 439-46.

**Blandine G.** (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin. These de doctorat Université Joseph Fourier. P : 10.

**Bloomer R.J., Goldfarb A.H., McKenzie M.J., You T., Nguyen L.** (2004). Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* **14** (4): 377-88.

**Bonnefont-Rousselot D.** (2014). Obésité et stress oxydant. *Obésité.* **9** p : 8-13.

**Bonnefont-Rousselot D., Théron P., Delattre J.** (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. In Delattre J., Durand G., Jardillier JC. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences Flammarion Paris. P : 59-81.

**Bossokpi I.P.L.** (2002). Etude des activités biologiques de Fagara xanthoxyloïdes Lam (Rutaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie, Université de Bamako.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Bouayed J.** (2010). Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Curr Nutr Food Sci.* **6** : 13-18.

**Boubekri C.** (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat: Université Mohamed Khider – Biskra.

**Brigelius-Flohe R., Traber M.G.** (1999). Vitamin E: function and metabolism. *Faseb j.* **13** : 1145-1155.

**Brot N., Weissbach H.** (2000). Peptide methionine sulfoxide reductase: biochemistry and physiological role. *Biopolymers.* **55**: 288-296.

**Brownlee M.** (2001). « Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications ». *Nature*, 414, (6865) p : 813-820.

**Brownlee M.** (2005). «The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism». *Diabetes.* **54** (6) : 1615-1625.

**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.

**Camille M., Mireille S.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris).* **27** (4) : 405-412.

**Camille M., Mireille. S.** (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris).* **27** (4) : 405-412.

**Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M.P., Hasselmann M., Leverve X.** (2006). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.* Edition Springer. P : 255.

**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.C., Zhu B.Z., Frei B.** (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res.* **7** (5) : 349-354.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Ceriello A.** (2003). « New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy ». *Diabetes Care*. 26 (5) : 1589-1596.

**Chan K.M., Decker E.A.** (1994). Endogenous Skeletal-Muscle Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34 (4) : 403-426.

**Chappuis P., Favier A.** (1995). Les oligoéléments en nutrition et en thérapeutique. Lavoisier, Tec et Doc., Paris. P : 474.

**Chen P., Chakraborty S., Mukhopadhyay S., LEE E., Paoliello M., Bowman A., Aschner M.** (2015). Manganese homeostasis in the nervous system. *J. Neurochem*. 134 (4): 601-610.

**Chérifa B.** (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse présentée en vue de l'obtention Du diplôme de Doctorat en sciences, Université Mohamed Khider – Biskra.

**Cillard J.** (2011). Physiopathologie du Stress Oxydant: Faculté de Pharmacie Université de Rennes. EA 1274 « Mouvement-Sport-Santé ».

**Cillard J., Cillard P.** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *OCL*. 13 (1) : 24-29.

**Clarkson P.M., Thompson H.S.** (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72 (2): 637-646.

**Clémentine P.** (2014). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat de l'Université Paris-sud. P : 157.

**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.

**Curtay J.P., Robin J.M.** (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*.

**Das-Evcimen N., King G.L.** (2007). « The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes ». *Pharmacological Research*. 55 (6) : 498-510.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Daum-badouard C.** (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. Université joseph fourier-grenoble.

**De Jaeger C.** (2011). Les théories du vieillissement. *Médecine & Longévité*. **3** : 155-174.

**De Leiris J.** (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*. **19** : 40-44.

**Defraigne J.O.** (2005). «Un mecanisme physiopathologique central a l'origine des complications du diabete? ». *Revue médicale de Liège*. **60** (5-6) : 472-478.

**Defraigne J.O., Degrunne F., Malherbe C., Paquot N., Pincemail J., Voussure S.** (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*. **21** : 66-75.

**Desport J.D.** (2002). Nutrition et stress oxydant. *Stress oxydant et maladies neurodégénératives*. *Nutr Clin Métabol*. 253-25.

**Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F.** (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*. **65** : 337-353.

**Diallo A.** (2005). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* willd (myrtaceae). Thèse de doctorat en pharmacie, Univercité de Bamako. P : 13-14.

**Dröge W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. **82** (1) : 47-95.

**Du X.L., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I.G., Goldberg H., Ziyadeh F., Wu J., Brownlee M.** (2000). « Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97** (22) : 12222-12226.

**Dusek P., Roos P., Litwin T., Schneider S., Flaten T., Aaseth J.** (2015). The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **31** : 193-203.



## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Dwassy A.** (2014). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. These de doctorat Université Mohammed V-souissi-faculté de médecine et de pharmacie - Rabat. P : 7.

**Dziezak J.D.** (1986). Preservatives: Antioxidants. *Food Technol.* **40** p: 94-102.

**Erlund.I** (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research.* **24** : 851-874.

**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.

**Figuroa-Romero C., Sadidi M., Feldman E.L.** (2008). «Mechanisms of disease: The oxidative stress theory of diabetic neuropathy». *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* **9** (4) : 301-314.

**Finkel T.** (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **476**: 52-54.

**Fisher-Wellman K., Bloomer R.J.** (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine.* **8**: 1-25.

**Fitsanakis V., Zhang N., Garcia S., Aschner M.** (2009). Manganese (Mn) and Iron (Fe): Interdependency of Transport and Regulation. *Neurotoxicity Research.* **18** (2) : 124-131.

**Flora S.J., Mittal ., Mehta A .**(2008) . Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* **128** : 501-523.

**Fonc J.H., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P.** (2007). Le stress oxydant. P : 629.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Freeman B.A., Young S.L., Crapo J.D.** (1983). Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury. *J Biol Chem.* **258** : 12534 - 12542.

**Freeman B.A., Crapo J.D.** (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem.* **256**: 10986-10992.

**Giovanella F., Ferreira G.K., De Prá S.D.T., Carvalho-Silva M., Gomes L.M., Scaini G., Gonçalves R.C, Michels M., Galant L.S., Longaretti L.M., Dajori A.L., Andrade V.M., Dal-Pizzol F., Streck E.L., De Souza R.P.** (2015). Effects of primaquine and chloroquine on oxidative stress parameters in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* **87** (2) : 1487-1496.

**Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G.** (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med.* **15** : 435-45.

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

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

**Guichard C., Pedruzzi E., Fay M et al.** (2006). Les Nox/Duox : une nouvelle famille de NADPH oxydases. *Med Sci (Paris).* **22** : 953-959.

**Guillouty A.** (2016). Plantes médicinales et antioxydants. Thèse de Doctorat de l'Université Toulouse III Paul Sabatier, Faculté des sciences pharmaceutiques.

**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.

**Harman D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11** : 298-300.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. **13**: 572-584.

**Hong J.H., Kim M.J., Park M.R., Kwag O.G., Lee I.S., Byun B.H., Lee S.C., Lee K.B., Rhee S.J.** (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*. **340** : 107-115.

**Hu Ibert A.J.** (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* **23** : 277- 288.

**Huggins T.G., Wells-Knecht M.C., Detorie N.A., Baynes J.W., Thorpe S.R.** (1993). Formation of o-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. *J BiolChem*. **268**: 12341-12347.

**Hwang I., Lee J., Huh J.Y. et al.** (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*. **61**: 728-738.

**Jacques B., André R.** (2004). *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris. p : 217-219-220-223-225.

**Jean-Philippe B.** (2013). Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, Ecole Doctorale des Sciences de la Mer. P : 4.

**Jomova K., Valko M.** (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease/ *Toxicology*. **283**: 65-87.

**Justine P., Odile P., Carole P.** (2005). Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat Université Paul-Sabatier de Toulouse. P : 14.

**Kaneto H., Xu G., Song K.H., Suzuma K., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir G.C.** (2001). « Activation of the Hexosamine Pathway Leads to Deterioration of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function through the Induction of Oxidative Stress ». *Journal of Biological Chemistry*. **276** (33) : 31099-31104.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Khaled O.** (2017). Caractérisation et modélisation de la production des radicaux libres oxygénés par la chimie de Fenton dans un milieu mimétique de la viande. Thèse de Doctorat de l'Université Clermont Auvergne, France.

**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.

**King G.L., Loeken M.R.** (2004). « Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications ». *Histochemistry and Cell Biology.* **122** (4) : 333-338.

**Klimczak I., Malecka M., Szlachta M., Gliszczynskaswiglo A.** (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Comp Anal.* **20** : 313-322.

**Ko T.P., Safo M.K., Musayev F.N., Di Salvo M.L., Wang C., Wu S.H., Abraham D.J.** (2000). Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **56** : 241-245.

**Krause K.H.** (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57** : 28-29.

**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.

**Laliberte J., Labbe S.** (2008). "The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast". *Med Sci (Paris).* **24** (3) : 277-283.

**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.

**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.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Lima V.V., Spitler K., Choi H., Webb R.C., Tostes R.C.** (2012). « O-glcnacetylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? ». *Clinical Science* (London, England : 1979). **123** (8) : 473-486.

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

**Lushchak V.I.** (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology.* **101** : 13-30.

**Lyons M. E. G., Fay H. G., McCabe T., Corish J., Vos J.G., Kelly A.J.** (1990). "Charge percolation in electroactive polymers". *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.* **86** : 2905.

**Mabile L., Meilhac O., Escargueil-Blanc I., Trolly M., Pieraggi M.T., Salvayre R., Nègre-Salvayre A.** (1997). Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by human cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17** (8) : 1575-1582.

**Machlin L.J., Bendich A.** (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, 1p: 441-445.

**Manzl C., Enrich J., Ebner H., Dallinger R., Krumschnabel G.** (2004). Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology.* **196** : 57-64.

**Marnett L.J.** (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* **424** p:83-95.

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

**Martinez-Cayuela M.** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.* **77** : 147-161.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Mc Lennan H.R., Degli Esposti M.** (2000). The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr.* **32** (2) : 153-62.

**McMichael M.** (2007). Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative mechanism for diabetic complications ». *Kidney International.* **58** (77) : S26-S30.

**Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S.** (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews.* **3** : 173-193.

**Milane, H.** (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'Université de Louis Pasteur. P : 13-36.

**Mirkhalaf F., Mason T.J., Morgan D.J., Saez V.** (2011). Frequency Effects on the Surface Coverage of Nitrophenyl Films Ultrasonically Grafted onto Indium Tin Oxide. *Langmuir.* **27** : 1853.

**Morel Y., Barouki R.** (1999). Respression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* **342** (3) : 481-96.

**Moumen R., Nouvelot A., Duval D., Lechevalier B., Viader F.** (1997). "Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis". *Journal of the Neurological Sciences.* **151** : 35.

**Mozhdeganloo Z., Moghadam Jafari A., Koochi M.K., Heidarpour M.** (2015). Permethrin-induced oxidative damage in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its attenuation by vitamin C. *IJVR.* **17** (1) : 31-35.

**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 serumalbumin. *FEBS Lett.* **331** : 281-284.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M.** (2000). « The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*. 58 (77) S-26-S-30.

**Northrop-Clewes C.A., Thurnham D.I.** (2007). Monitoring micronutrients in cigarette OCL. **13** (1) : 24-29.

**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.

**Pamplona R, Portero-Otin M., Riba D., Requena J.R., Thm-pe S.R., Lopez-Torres M., Barja G.** (2000). Low fatty acid unsaturation: A mechanism for lowered lipoperoxidativ modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *Journals Gerontol. Ser. a-Biological Sei. Med. Sei.* **55** : 286- 291.

**Pamplona, R., Costantini, D.** ( 2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **301** p : 843-863.

**Pelli K., Lyly M.** (2003). Les antioxydants dans l'alimentation. *Flair & Flow. Paris*<sup>3<sup>ème</sup></sup> Edition. P : 6-28.

**Petersen M., Simmonds M. S.** (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. **62** : 121-125.

**Pincemail J. et al.** (1998). Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*. **3** : 133-8.

**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).

**Pincemail J., Karine B., Karine C., Jean-Olivier D.** (2002). Mécanismes Physiologiques de la défense Antioxydante. *Physiological Action of Antioxydant Defences. Nutritio Clinique et métabolisme*. **16** (6) : 233-239.

**Powers S., Jackson M.** (2008). Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev*. **88** : 1243-1276.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Purchas R.W., Rutherford S.M., Pearce P.D., Vather R., Wilkinson B.H.P.** (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10 and creatine. *Meat Science*. **66** (3) : 629-637.

**Qutub A.A, Popel A.S.** (2008). Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol*. **28** (16) : 5106-19.

**Raja L.** (2011). Etude de l'Effet de l'Oxygène sur la Physiologie et le Métabolisme de la bactérie hyperthermophile anaérobie *Thermotoga maritima*. Thèse de Doctorat de l'Université de Carthage Tunis et Université de Provence Marseille.

**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.

**Regoli F., Giuliani M.E.** (2014). Oxidative Pathways of Chemical Toxicity and Oxidative Stress Biomarkers In Marine Organisms. *Marine environmental research*. **93**: 106-117.

**Renuka M., Suneetha Y., Srinivasulu Reddy M.** (2017). Cadmium Induced Oxidative Stress in Wistar Rats: Ameliorative Effect of Quercetin and Embilica Officinalis Plant extracts. *Toxicology and forensic medicine*. P : 26-35.

**Reuka B, Rajurkar Z.H., Govind T.G.** (2003). Studies on Levels of glutathione S-transferase ,its isolation and purification from *Helicoverpa armigera* . *Current Science*. **85** : 1355 - 1360.

**Rhee S.G., Chae H.Z., Kim K.** (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* .**38** : 1543-1552.

**Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M.** (2001). *Melissa officinalis*, L: study of antioxidant activity in supercritical residues. *J Supercritical Fluids*. **21** : 51-60.

**Rollin F.** (2002). Mise en évidence des carences en oligo-éléments dans les exploitations bovines. *Proceedings of the Veterinary Sciences Congress*. 10 : 95-106.



## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Ronald St-Louis.** (2011). Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI Pierre et Marie Curie.

**Ruas C.B., Carvalho C., dos 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.

**Ryter S.F., Tyrell R.M.** (2000). The heme synthesis and degradation pathways : role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro and antioxidant properties. *Free Rad. Res.* **36** : 1299-1306.

**Scheibmeir H.D., Christensen K., Whitaker S.H., Jegaethesan J., Clancy R., Pierce J.D.** (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* **21** (1) : 24-8.

**Shiv K.** (2011). Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Adv. Appl. Sci. Res.* **2** (1): 129-135.

**Sies H.** (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* **215** (2) : 213-9.

**Simic M.G., Jovanovic S.V.** (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. *J Am chem Soc.* **111** : 5778-5782.

**Skotheim T. A.** (1986). "Handbook of Conducting Polymers ». M. Dekker. **2** : 1986 - 1417.

**Skulachev V.P.** (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *Febs lett.* **423** : 275-280.

**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.

**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.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Stahl W., Sies H.** (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 46 (2) : 14-8.

**Stahl W., Sies H.** (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15** (5) : 291-6.

**Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L.** (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320** (14): 915.

**Storz P., Jakob U., Reichmann D.** (2013). Oxidative Stress in Cancer, Oxidative Stress and Redox Regulation. *Media Dordrecht. P* : 427-447.

**Suzuki Y., Nakao T., Maemura H., Sato M., Kamahara K., Morimatsu F., Takamatsu K.** (2006). Carnosine and anserine ingestion enhances contribution of nonbicarbonate buffering. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* **38** (2) : 334-338.

**Swartz H.M., Sarna T., Zecca L.** (1992). Modulation by neuromelanin of the availability and reactivity of metal ions. *Ann Neurol.* 32 : 69-75.

**Taibur R., Ismail H., M. M. Towhidul I., HossainUddin S.** (2012). Oxidative stress and human health. **3**: 997-1019.

**Tessier F., Marconnet P.** (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science and sports.* **10** (1) : 1-13.

**Thannickal V.J., Fanburg B.L.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **279**: 1005-1028.

**Turrens J.F., Freeman B.A., Crapo J.D.** (1982). Hyperoxia increases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **217** : 411-421.

**Turrens J.F.** (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Rep.* **17** : 3-8.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**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., Omova K.J.** (2011). Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling.* P : 17-32.

**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.

**Velez S., Nair N.G., Reddy V.P.** (2008). Transition metal ion binding studies of carnosine and histidine: Biologically relevant antioxidants. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces.* **66** (2) : 291-294.

**Vogt W.** (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med.* **18** : 93-105.

**Wellen K.E., Thompson C.B.** (2010). Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molec Cell.* **40** : 323-32.

**William R.** (2013). Nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surfaces d'électrodes à base de sels de diazonium : application aux capteurs à antioxydants. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse. P : 35.

**William R.** (2013). Nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surfaces d'électrodes à base de sels de diazonium : application aux capteurs à antioxydants. Thèse de doctorat de l'Université Toulouse III Paul Sabatier. P : 53.

**Wolin M.S.** (1996). Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation.* **3** (1):1-17.

**Yagi K.** (1970). A rapid method for evaluation of autoxidation and antioxidants. *Agric.Biol. Chem.* **34** (1) : 142-145.

## RÈFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Zerargui F.** (2015). Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. Thèse de Doctorat de l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. P:18.

**Zhao P., Wang J., Ma H., Xiao Y., He L., Tong C., Wang Z., Zheng Q., Dolence E.K., Nair S., Ren J., Li J.A.** (2009). Newly synthetic chromium complex-chromium (D-phenylalanine) 3 activates AMPactivated protein kinase and stimulates glucose transport. *Biochem Pharmacol.* **77** (6) : 1002-10.

**Zhihua J., Elias S.J.A., Ying M., Linda J., Jiming S., Siqu Z., Shujun L., Ruiying W., Tianzhu Z., Ganglin Y., Junqiu L., Jiacon S., Guimin L.** (2004). Expression of Selenocysteine containnig glutathion S-transferase in *Escherichia coli*. *Biochem and Bioph Res commun.* **321** : 94 - 101.