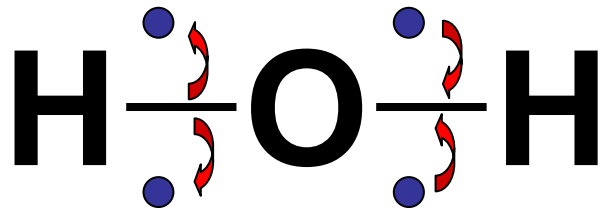


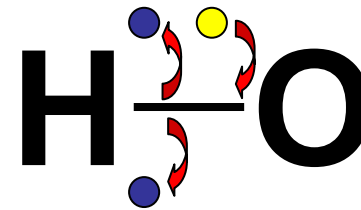
# **Relations entre stress oxydant et résistance à l'insuline**

# Notion de radical libre

Un **radical libre** (RL) est une espèce chimique qui possède un électron non apparié (célibataire) sur sa couche périphérique



électrons de la liaison H<sub>2</sub>O



électrons célibataire  
du radical hydroxyle

Le radical est doté **d'une réactivité particulière**

Afin d'apparier son électron célibataire, il peut se comporter **avec d'autres atomes ou molécules** comme :

un oxydant

un réducteur

# Notion de radical libre

Les **radicaux libres** impliqués dans le **stress oxydant** présentent **un électron célibataire** sur un atome d'oxygène

Ces **radicaux libres** peuvent être produits *in vivo* ou *in vitro* soit :

Par rupture homolytique d'une liaison covalente en deux composés conservant un électron célibataire

Par la perte ou le gain d'un électron chez une espèce non radicalaire

*In vivo* ils peuvent être générés en faible quantité lors du métabolisme normal de l'oxygène (CRM)

# Formation des radicaux libres

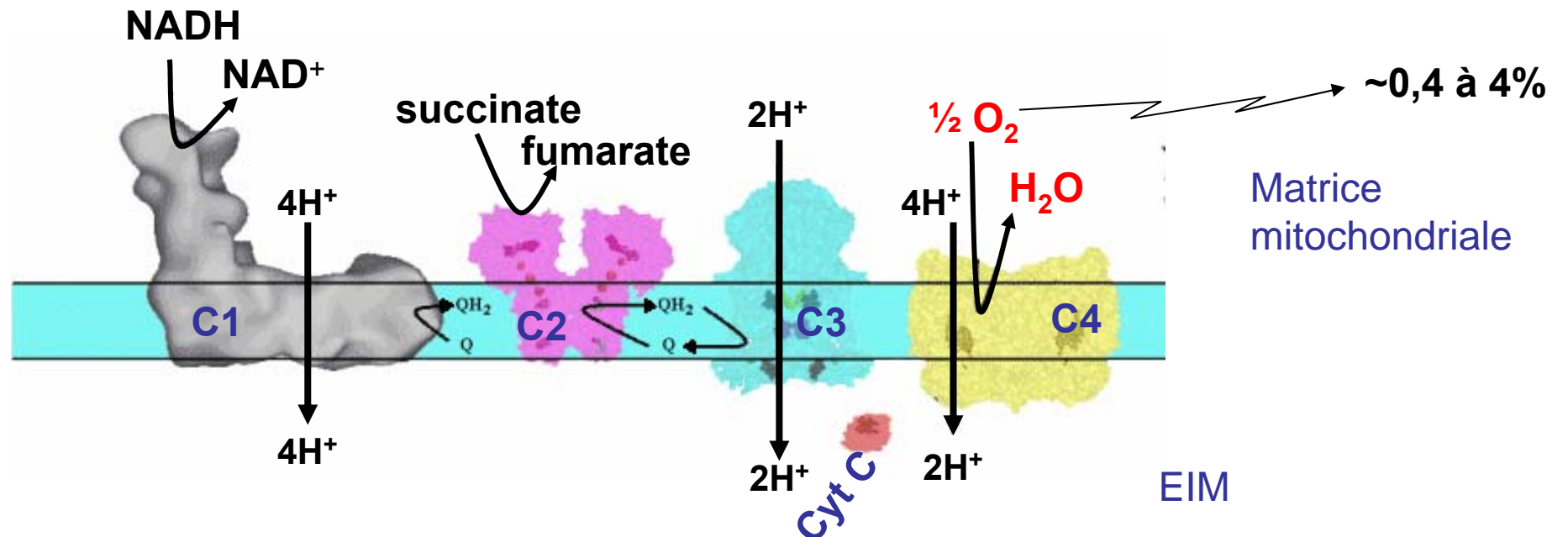
La CRM permet la réduction de l'oxygène moléculaire en 2 H<sub>2</sub>O

Cette réduction directe :

- implique la présence de quatre électrons
- est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes localisées dans la membrane interne de la mitochondrie.

Les conséquences de cette activité de la CRM sont doubles et paradoxales

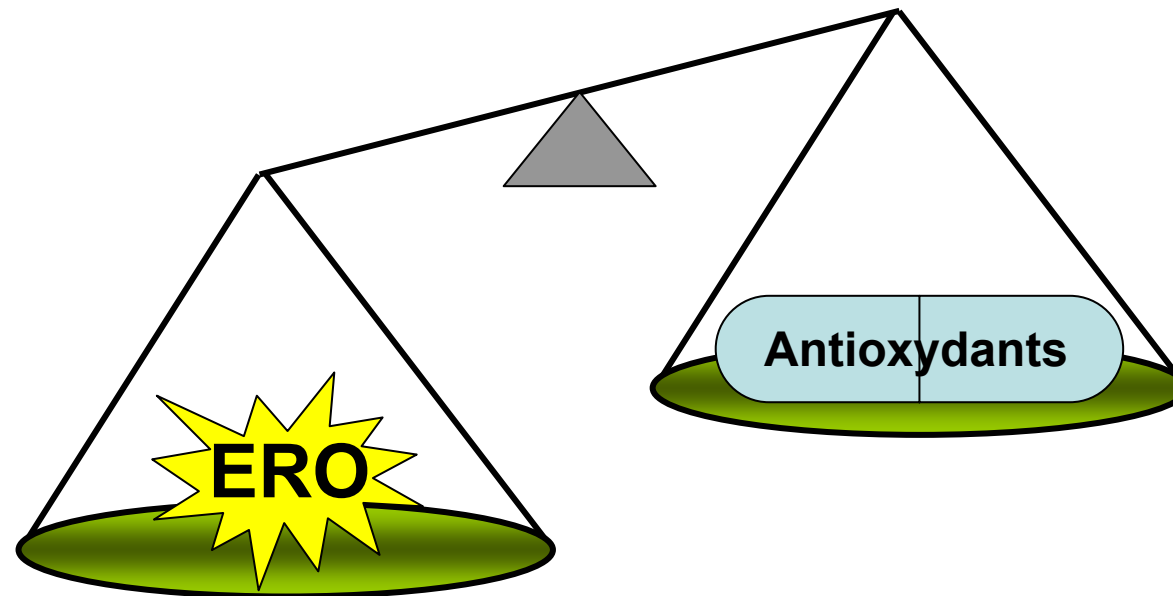
- la mitochondrie fournit 36 ATP
- **~0,4 à 4% de l'oxygène** ne sont pas correctement convertis en eau



# Stress oxydant

Le **stress oxydant** est observé lorsque la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dépasse les capacités de défense des tissus

Il entraîne des altérations des composants cellulaires, dues aux réactions chimiques des ERO avec les **lipides**, les **protéines** et les **acides nucléiques cellulaires**.

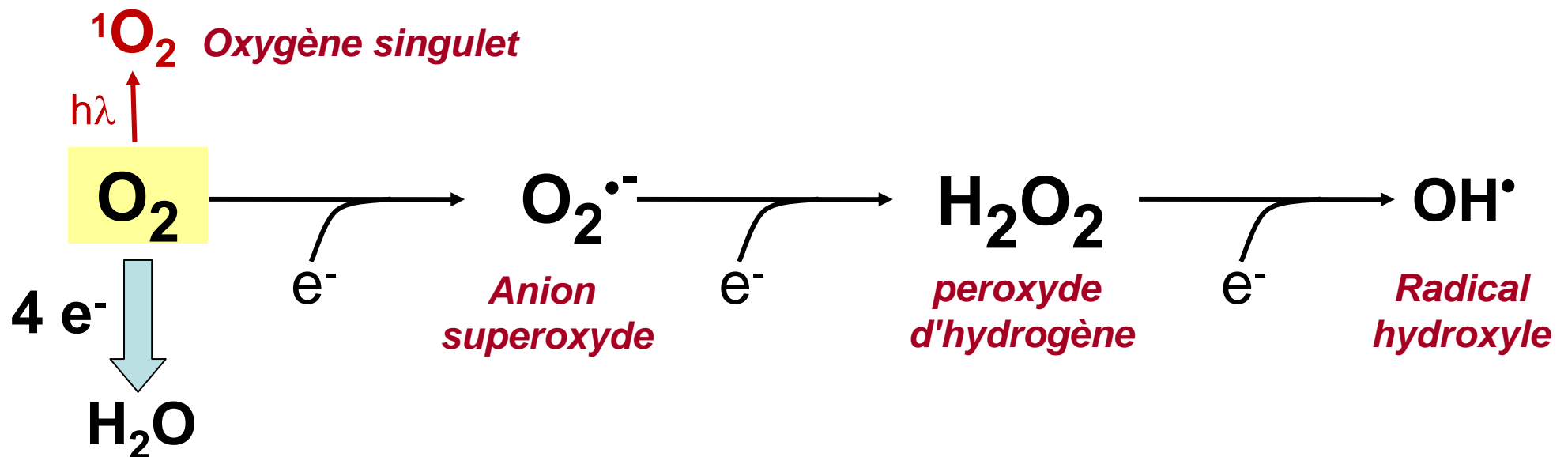


ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

# Production des Espèces Réactives de l'Oxygène

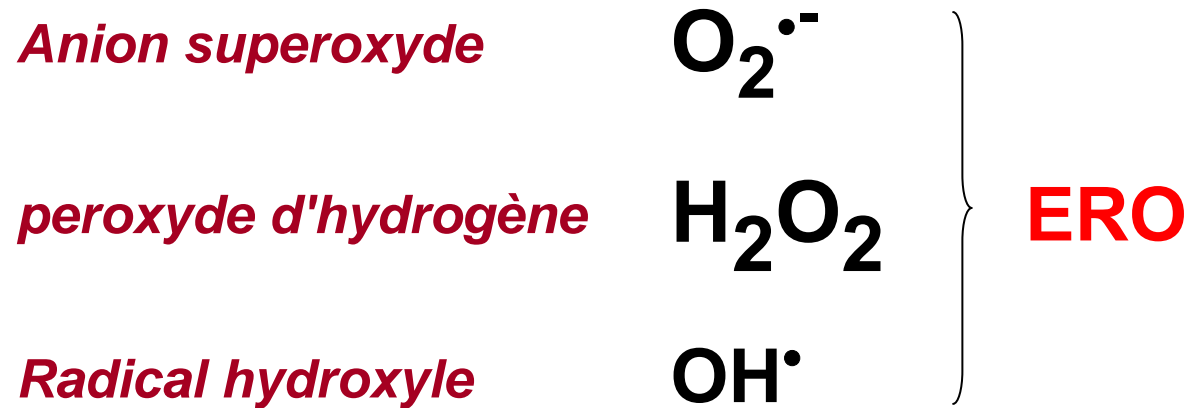
Par réduction monoélectronique, l'oxygène peut donner naissance à des **Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)** parmi lesquelles figurent **l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ )** ou le **radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ )**

**ERO** → un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un **électron libre** rendant cette espèce chimique beaucoup plus réactive que l'atome ou la molécule dont il (elle) est issu(e)



# Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

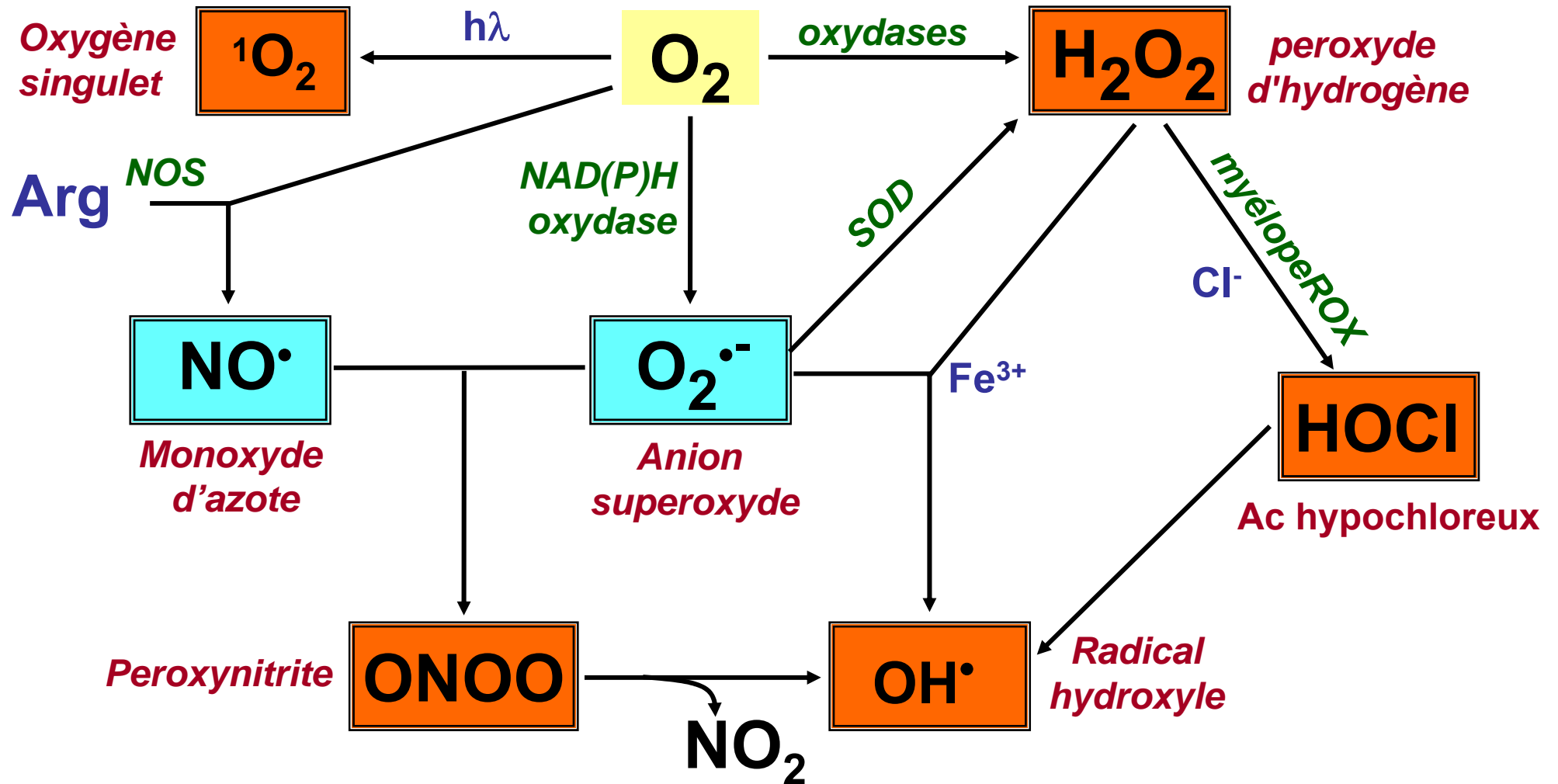
une **ERO** est beaucoup plus réactive que l'oxygène qui leur a donné naissance



Il existe d'autres ERO



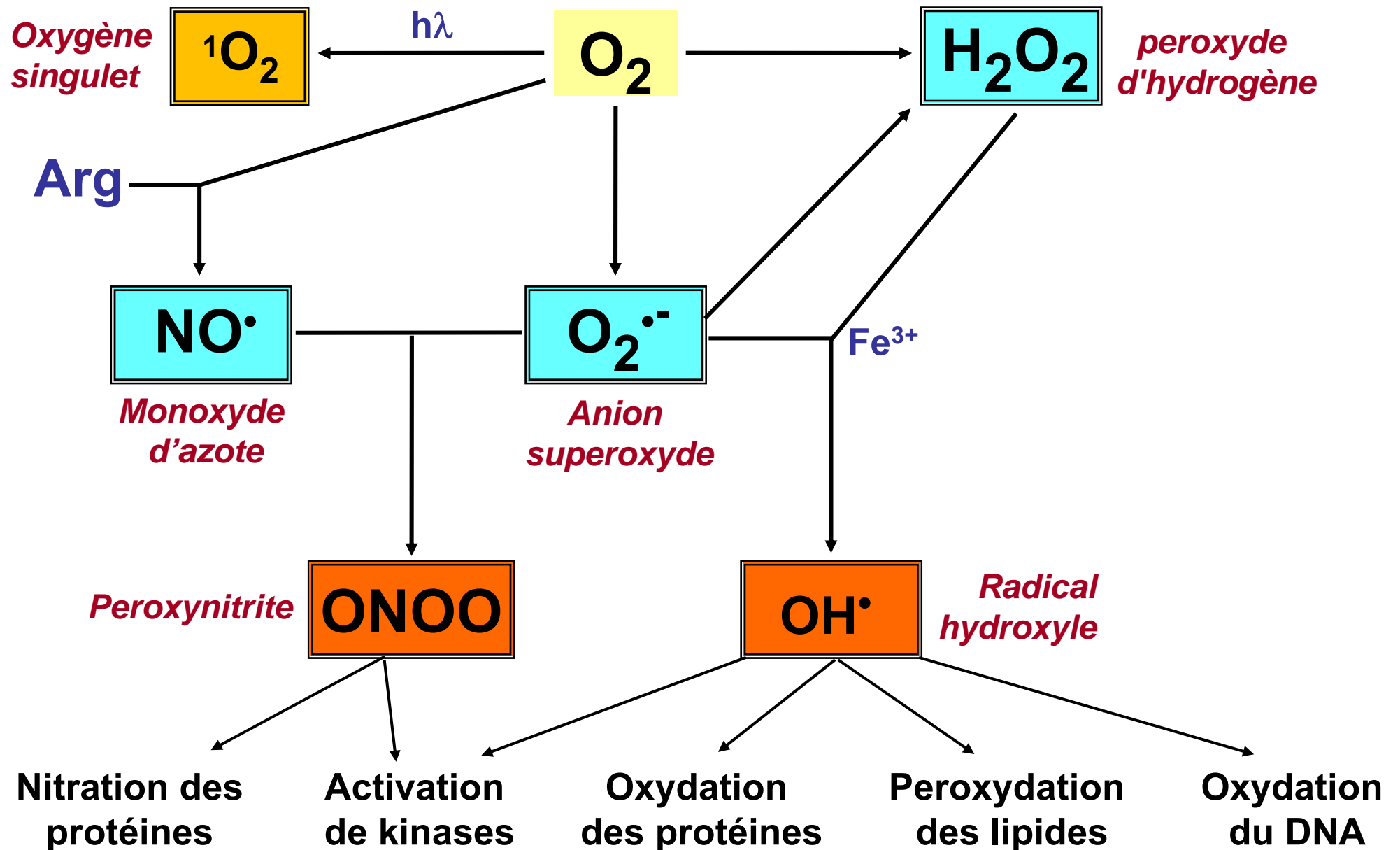
# Origine des différentes ERO



Radicaux primaires, dérivent de  $O_2$  ou de N par réduction de  $1e^-$

Espèces réactives de  $O_2$  (ERO)

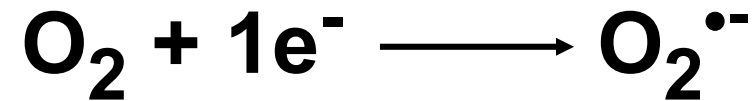
# Toxicité des différentes ERO



# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

## Anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

Produit par capture d'un électron → l'oxygène moléculaire est réduit en anion superoxyde :



Il est produit majoritairement par la CRM, mais également par des oxydases

Produit par une oxydase membranaire → **NAD(P)H oxydase** :

Modulation de la signalisation cellulaire

Intervention dans les régulations métaboliques

Parmi les RL du stress oxydant, **l'anion superoxyde est celui qui a la réactivité vis-à-vis des substrats la plus faible**

Il ne réagit pas avec les Ac nucléiques et les protéines

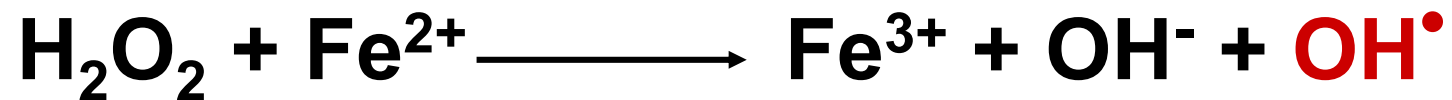
# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

## Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

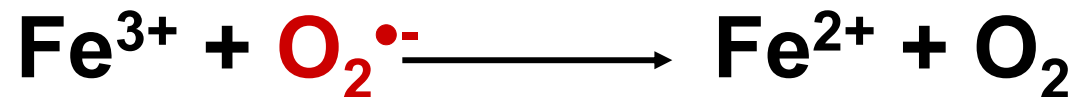
La coexistence de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène peut engendrer cette **espèce oxygénée très réactive**

Cette réaction est catalysée par des métaux de transition (Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>)

## Réaction de Fenton



Fe<sup>2+</sup> est reconstitué par divers réducteurs dont l'anion superoxyde



# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

## Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)

RLO produit *in-vivo* par les **NO Synthases (NOS)**



**NO<sup>•</sup> est caractérisé par :**

Une grande diffusibilité

Une réactivité limitée

Une 1/2 vie qui n'excède pas quelques secondes

**NO<sup>•</sup> est susceptible de réagir avec :**

La plupart des ERO

Les fonctions thiols

Les métaux (fer hémérique)

# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

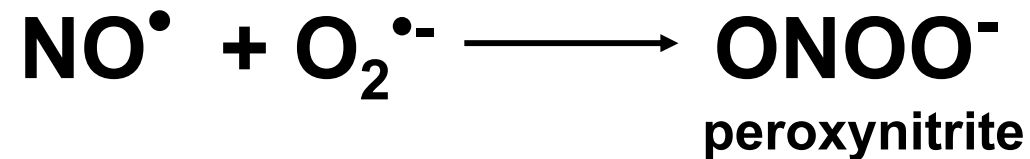
## Le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)

NO<sup>•</sup> peut être :

Oxydé en ion nitrosonium (NO<sup>+</sup>)

Réduit en anion nitroxyle NO<sup>-</sup>

La production concomitante de NO<sup>•</sup> et d'anions superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en un même site entraîne la formation du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) hautement cytotoxique



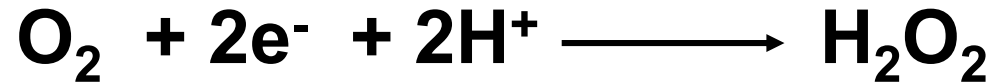
NO<sup>•</sup> se rapproche de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par sa faible réactivité sur les molécules biologiques

# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

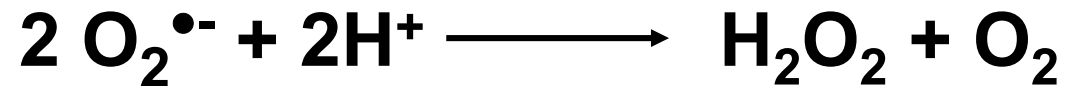
## Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Peut être obtenu :

Par réduction divalente de l'oxygène moléculaire (action des oxydases)



Par dismutation de l'anion superoxyde



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> électriquement neutre, **réactivité limitée** → diffuse à travers les membranes biologiques plus facilement que l'anion superoxyde

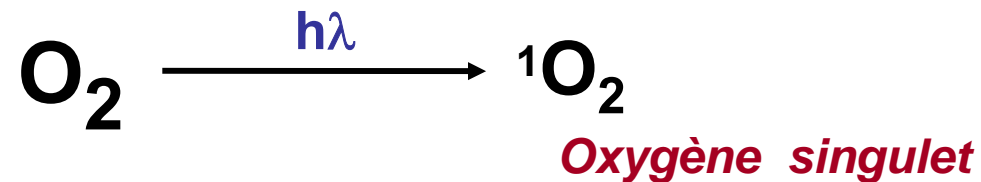
Il donne naissance à des radicaux plus réactifs.

# Les Espèces Réactives de l'Oxygène

## Oxygène singulet

Atome d'oxygène seul

- Il est très réactif - Durée de vie très courte
- Il est produit par transfert d'énergie lumineuse par des protéines telles que la riboflavine, la bilirubine et le rétinol



# ERO rencontrées dans l'organisme

## Les radicaux libres de l'oxygène

Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Faible action oxydative Formé par la mitochondrie Peut générer des radicaux secondaires
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$	<b>Très réactif</b> avec les macromolécules biologiques
Oxyde nitrique	$NO^{\bullet}$	Réagit avec $OH^{\bullet}$ → peroxynitrite

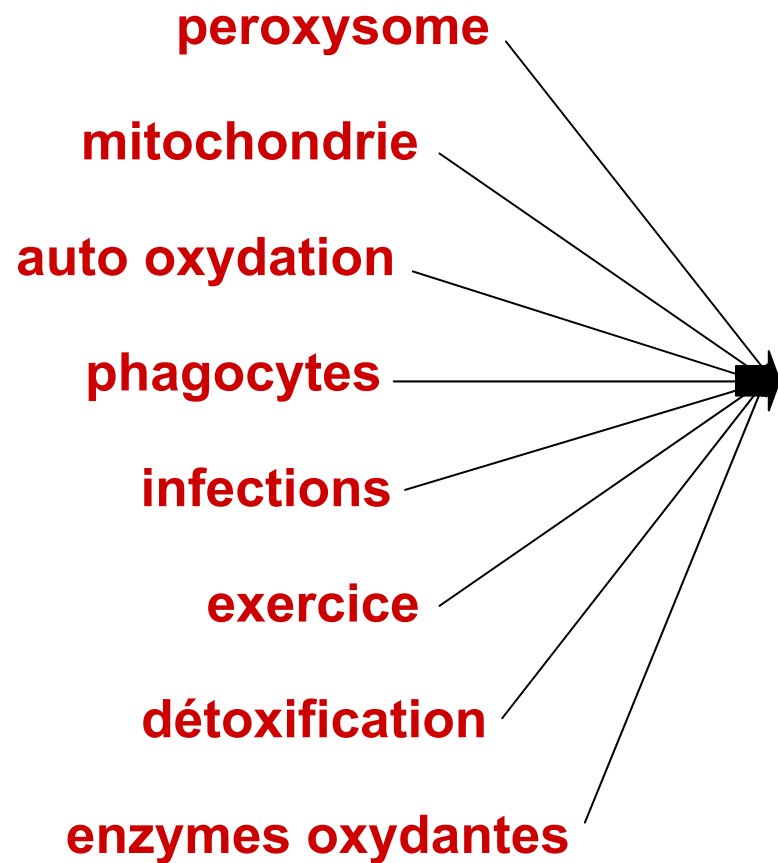
## Les espèces réactives de l'oxygène

Peroxynitrite	$ONOO^-$	<b>Très réactif</b> → nitration de Tyr Ac Aminé polaire
Oxygène singulet	$^1O_2$	Atome d'oxygène seul ; <b>Très réactif</b> ; Durée de vie très limitée
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	En présence Fe → radical hydroxyle

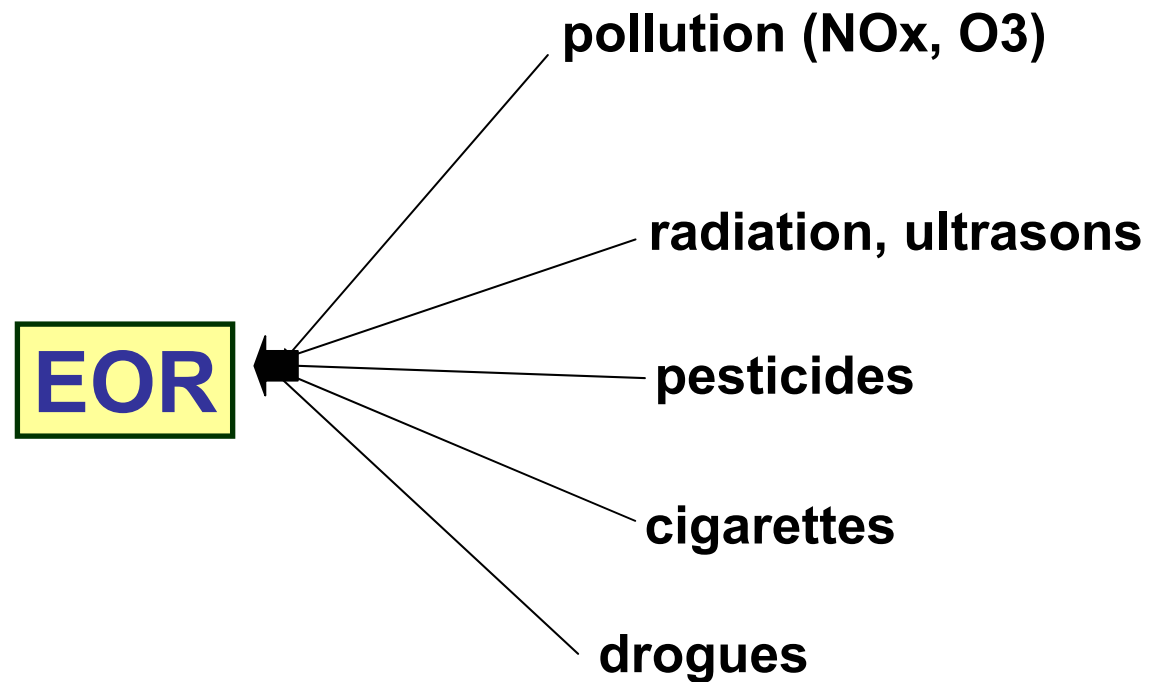
# Origine des EOR

## Sources

### *endogènes*

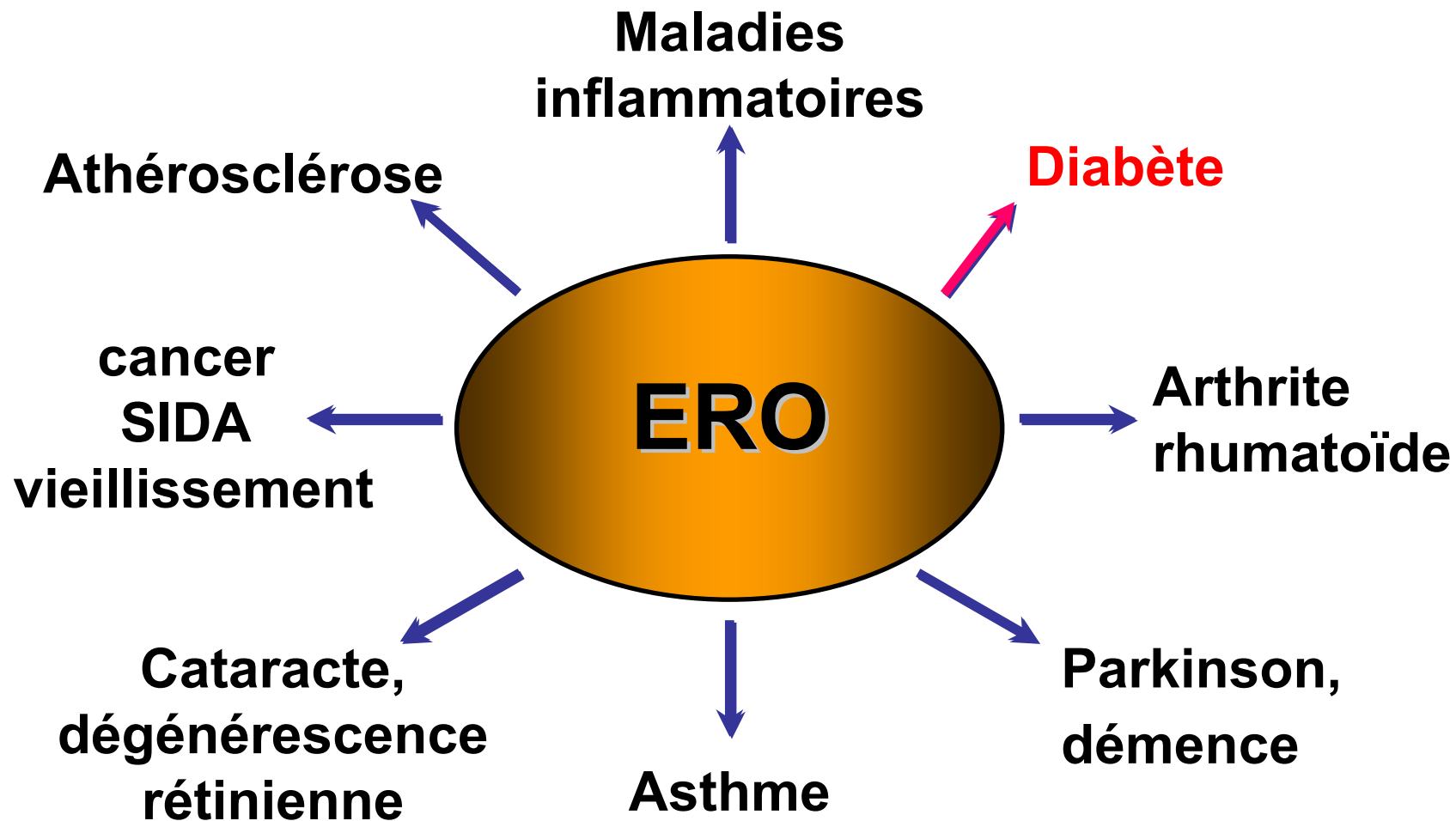


### *exogènes*



# ERO ET SANTÉ PUBLIQUE

Existence d'une association entre altération des systèmes de défense antioxydants et développement de nombreuses pathologies :



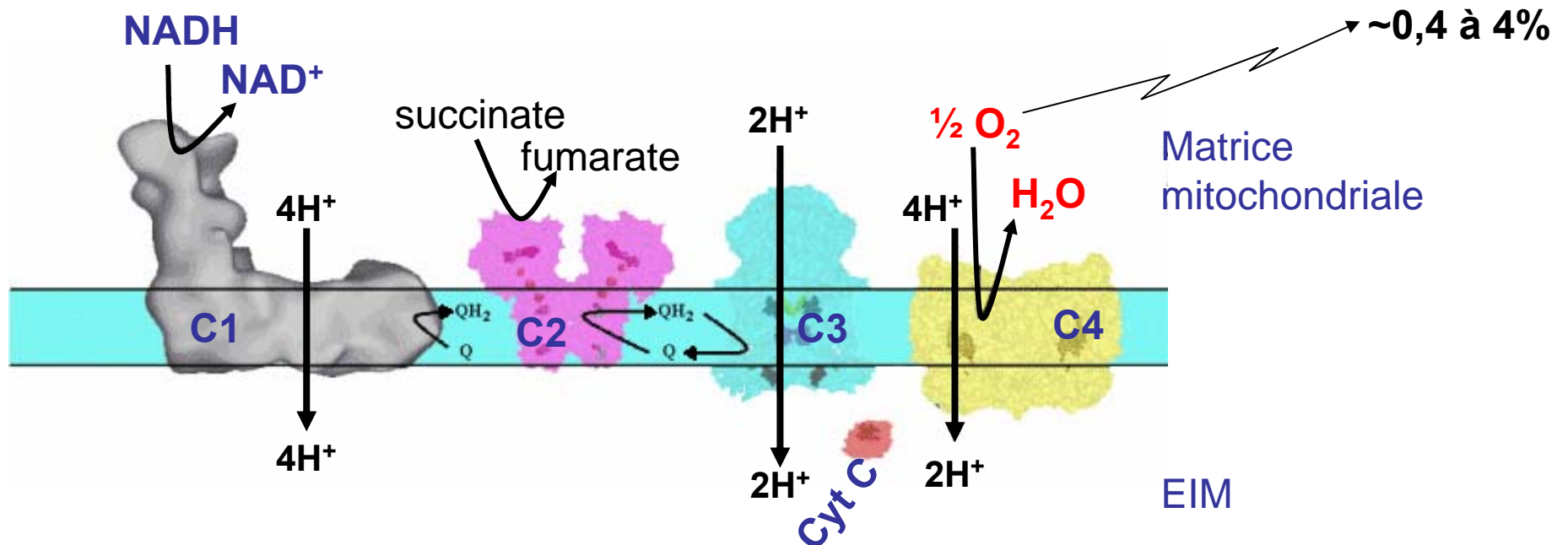
# Sources cellulaires des ERO

Dans les cellules → production essentiellement enzymatique :

## CRM

NAD(P)H oxydase membranaire

A degrés moindres { Xanthine oxydase  
Enzymes du REL (cyt P450)...



# Sources cellulaires des ERO

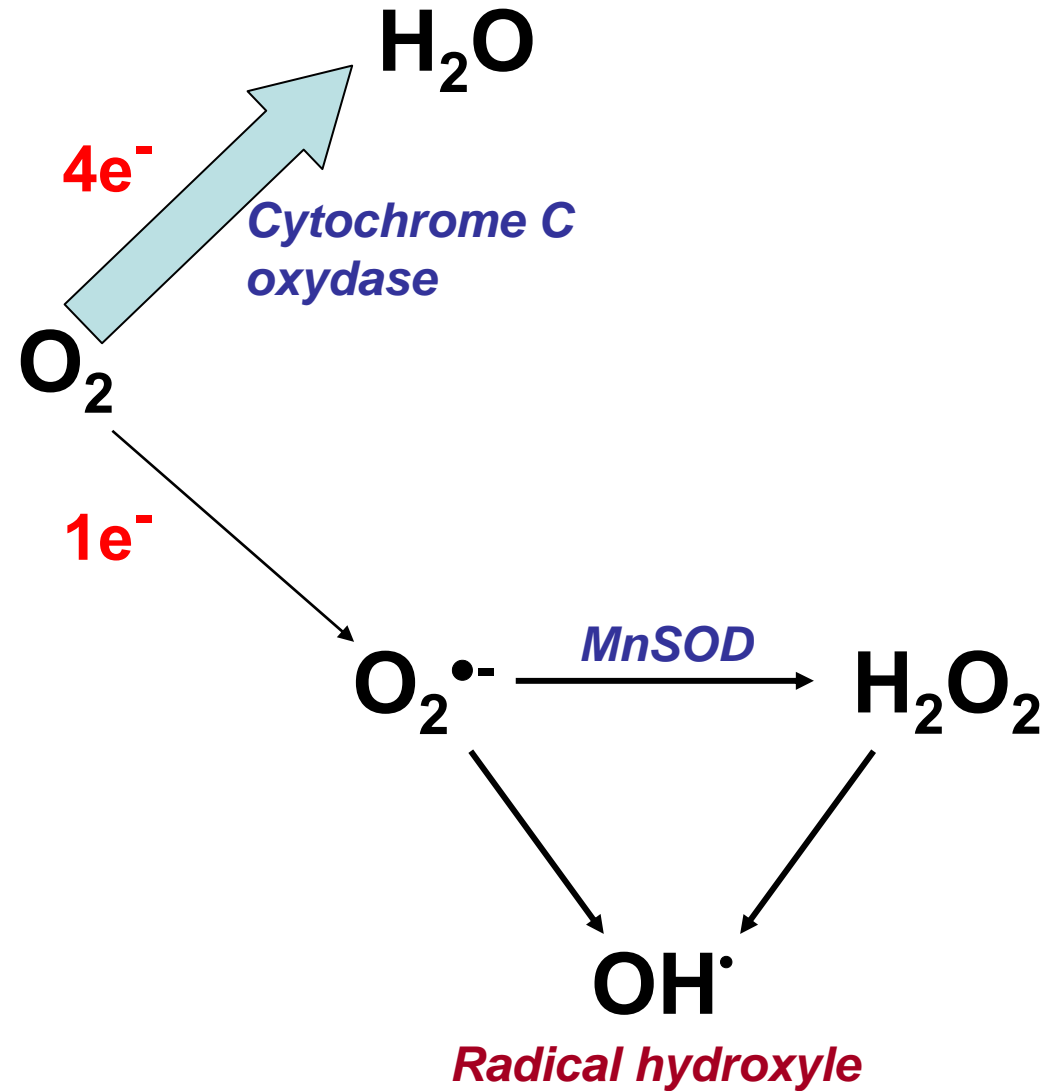
Au niveau mitochondrial

Tetraréduction

95%

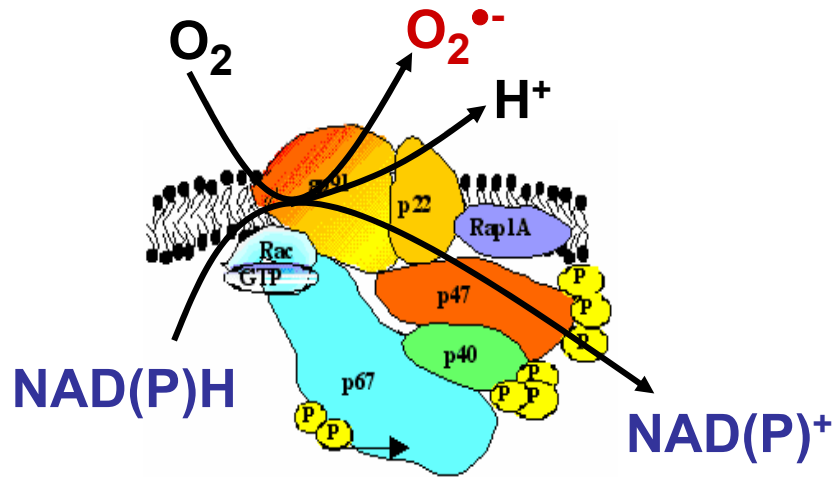
Monoréduction

3-5%

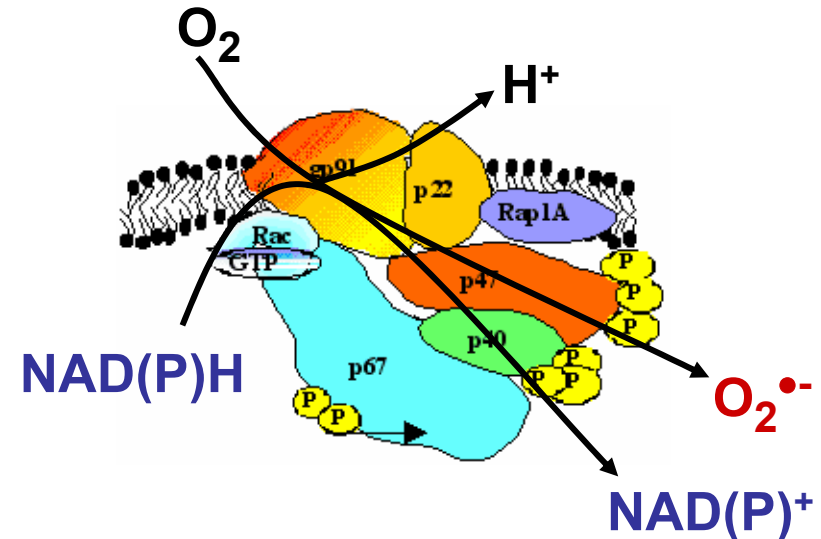


# Sources cellulaires des ERO

## NAD(P)H oxydase membranaire



**Polynucléaire neutrophile**



**Cellule musculaire lisse**

Complexe multimérique localisé au niveau de la membrane plasmique.

Complexe transmembranaire permettant d'interagir avec le substrat  $NAD(P)H$  cytoplasmique et de libérer l'anion superoxyde produit à l'extérieur de la cellule (PN) ou à l'intérieur (cellules musculaires lisses)

# Sources cellulaires des ERO

## Au niveau du peroxysome

Les peroxysomes utilisent une part importante de l'O<sub>2</sub>

Production majoritaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Glycolate oxydase - acyl-CoA oxydase - D-amino acide oxydase...

La **catalase** utilise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formée par ces enzymes pour oxyder différents substrats (AG) et pour la détoxification (éthanol)

## Au niveau du REL / CytP<sub>450</sub>

Réaction de mono-oxygénation



Le REL est riche en cytP<sub>450</sub> impliqués dans les processus de détoxification

# Sources cellulaires des ERO

## Autres systèmes de production

**Auto-oxydation**

**Cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase**

**Système de transport des électrons dans la membrane nucléaire**

**Xanthine/xanthine oxydase**

**Activation des polynucleaires**

**Hémoglobine et Myoglobine**

# Sources cellulaires des ERO

Les mitochondries : principale source de production de radicaux libres

Mitochondries	micrososome	peroxysome	cytosol
45%	20%	30%	5%
Exception pour le foie, où les microsomes sont les principaux producteurs			
Mitochondries	micrososome	peroxysome	cytosol
15%	45%	35%	5%

# **Systemes de Défense**

# **Systemes de Défense**

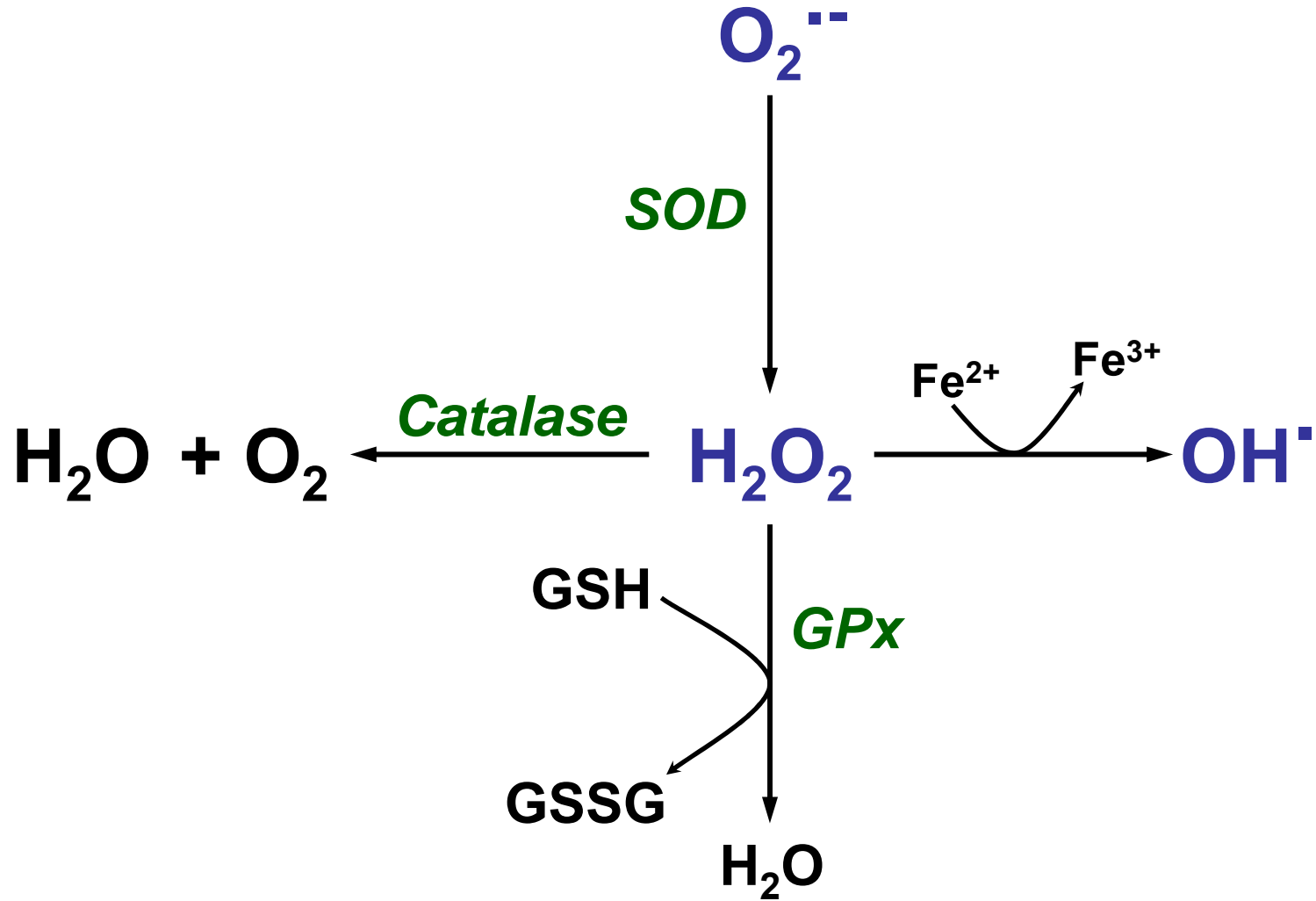
## **Systemes enzymatiques**

**Superoxyde dismutases**

**Catalase**

**GSH peroxydases**

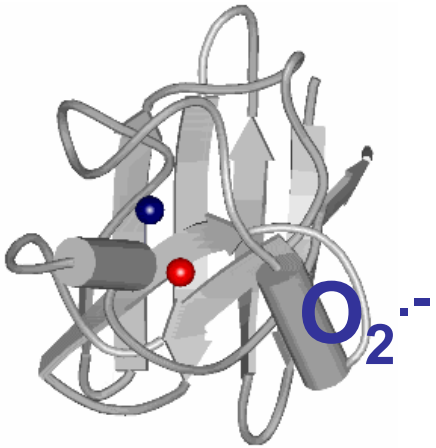
# Première ligne de défense



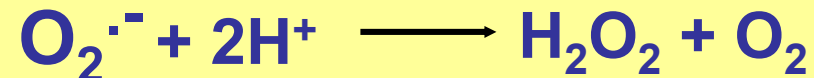
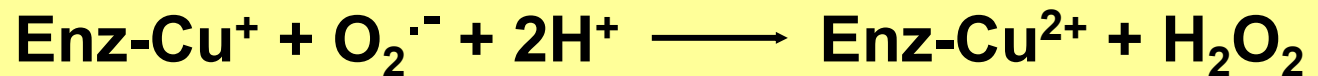
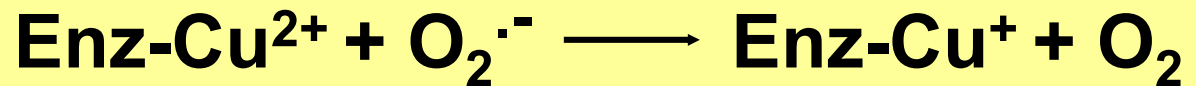
# Superoxyde dismutase



Enzyme qui permet l'élimination du radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en le métabolisant en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par une réaction de dismutation.



Différentes formes	SOD	Localisation
Cu/Zn-SOD	SOD1	cytosolique
Mn-SOD	SOD2	Mitochondriale (MIM)
Cu-SOD	SOD3	Matrice extracellulaire



# Catalase



Enzyme tétramérique héminique

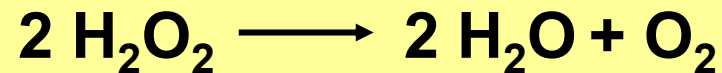
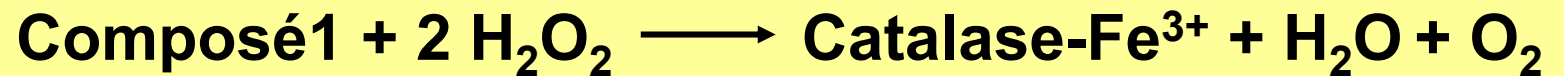
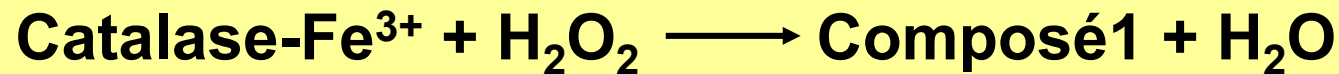
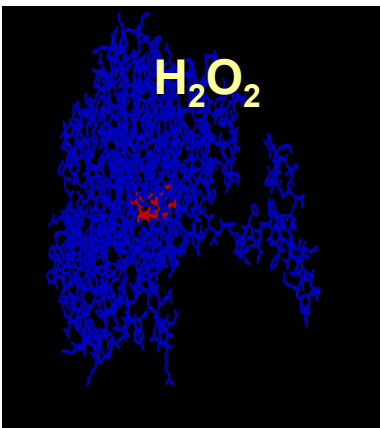
Chaque unité porte { un hème  
un NADPH

Présentes dans les peroxysomes d'un grand nombre de tissus  
Particulièrement abondantes dans le foie et les GR

Sont localisées dans les peroxysomes

La réaction se fait en deux étapes :

Substrat :  $\text{H}_2\text{O}_2$

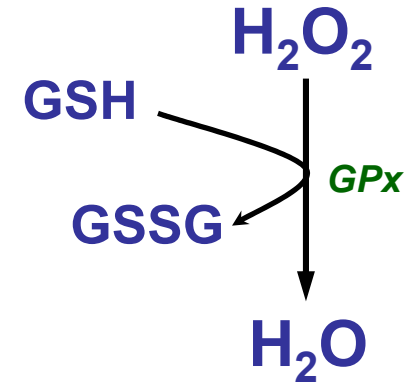


# Glutathion peroxydases

Enzyme à sélénocystéine

Enzymes capables de détoxifier  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'autres peroxydes d'origine lipidique.

Réaction couplée avec l'oxydation d'un substrat réducteur (GSH)



Quatre types différents (1 à 3 → tétramérique)

**GPx1** : localisation cytosolique, ubiquitaire, fortement exprimée

GR  
reins  
foie

**GPx2** : localisation cytosolique → cellules du tractus gastro-intestinal

**GPx3** : localisation plasmatique

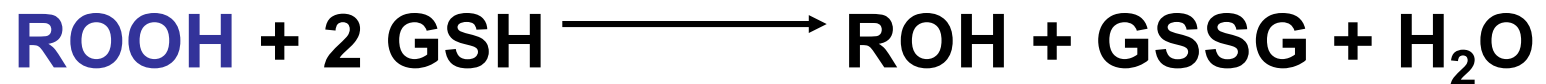
**GPx4** : **monomérique** - localisation interface MIN – cytoplasme

Au niveau des membranes, elle peut réduire les hydroperoxydes des Phospholipides et du Cholestérol (GSH 2<sup>ème</sup> substrat)

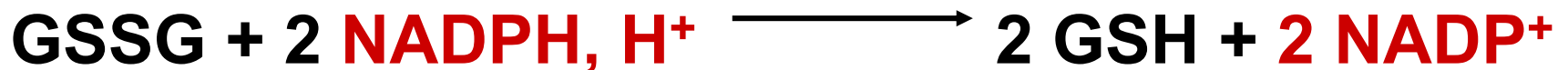
# Glutathion peroxydases

Substrats:  $\text{H}_2\text{O}_2$  et hydroperoxydes organiques de type ROOH

*Action de la Glutathion peroxydase*



*Glutathion réductase*



GPx ne sont pas spécifiques de  $\text{H}_2\text{O}_2$  → peuvent agir sur tous les hydroperoxydes des esters de Cholestérol ou des PL des Mb cellulaires

**GPx** sont spécifiques de GSH → toutes sont inhibées par le cyanure

# Systemes de Defense

**Systemes non enzymatiques : piégeurs de radicaux libres**

**Antioxydants liposolubles:**

- $\alpha$ -tocophérol
- carotène

**Antioxydants hydrosolubles:**

- ascorbate

# **LA DOUBLE VIE DES RADICAUX LIBRES**

# INTRODUCTION

## Faible concentration

**ERO** sont des médiateurs cellulaires ayant des fonctions diversifiées :

**ERO** impliquées dans inflammation; phagocytose et réaction immunitaire

**ERO** participent aux voies de transduction du signal de plusieurs Ho et FC (PDGF, insuline...)

$\frac{1}{2}$  vie courte, diffusion rapide, réactivité avec protéines et lipides → parfaits médiateurs

## Forte concentration

Équilibre redox perturbé → **ERO** s'accumulent → exercent une toxicité dépendante de la dose, de la nature et de la cellule

Cibles des **ERO** → ADN ; ARN ; protéines ; lipides et/ou glucides

Problème essentiel de la notion de seuil :

**Où commence la toxicité où finit la physiologie?**

# **Stress oxydant et résistance à l'insuline**

# INTRODUCTION

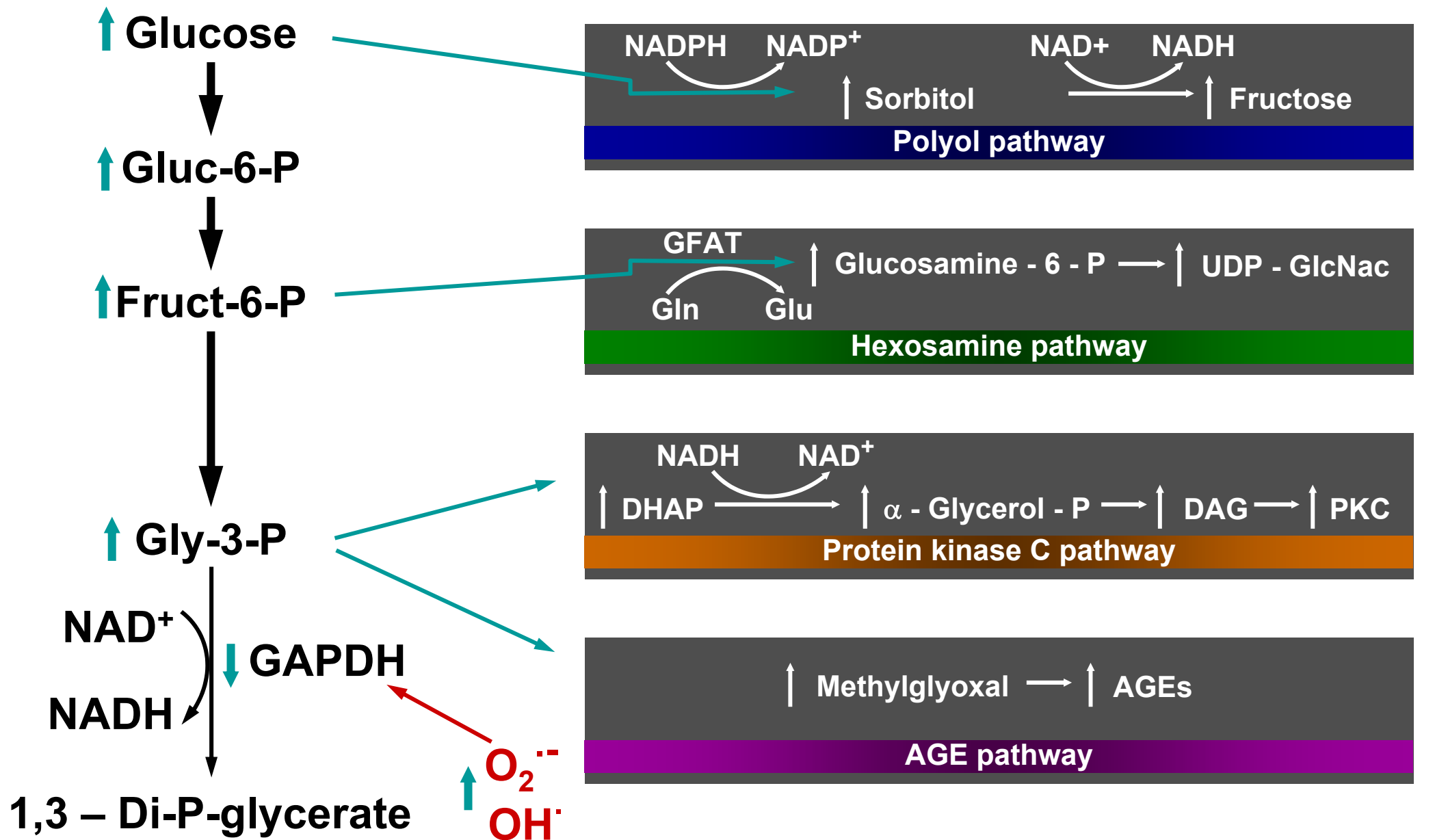
**L'hyperglycémie chronique** est impliquée dans la survenue des **complications macro et surtout microangiopathiques** par l'intermédiaire de l'exacerbation de 4 voies métaboliques :

- la voie des polyols
- l'activation accrue d'isoformes de PKC
- l'activation des hexosamines
- la glycation non enzymatique des protéines

***Ces voies sont toutes intriquées et aboutissent à un stress oxydant***

**A ces facteurs métaboliques liées à l'hyperglycémie sont associés des facteurs environnementaux et génétiques**

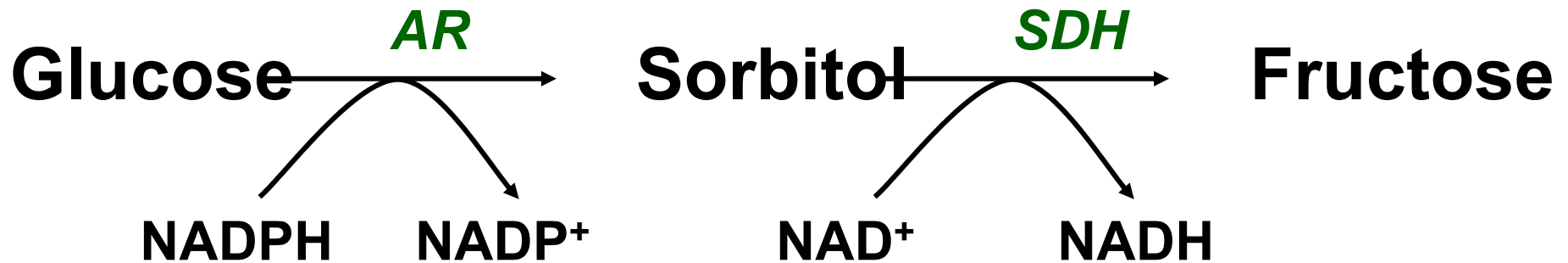
# Exacerbation de 4 voies métaboliques



adapted from M. Brownlee, (Nature 2001)

# Voie des polyols

Lorsque la concentration en glucose devient élevée → Activation de la voie des polyols dans les tissus insulino-indépendant



Conséquences :

- ⇒ Baisse des coenzymes (NADPH, NAD<sup>+</sup>)
- ⇒ Baisse du GSH → Baisse de l'activité des enzymes antioxydantes
- ⇒ Accumulation de sorbitol et de fructose peu diffusibles (osmolarité)

Rôle dans la **neuropathie diabétique** (pseudo ischémie de l'hyperglycémie)

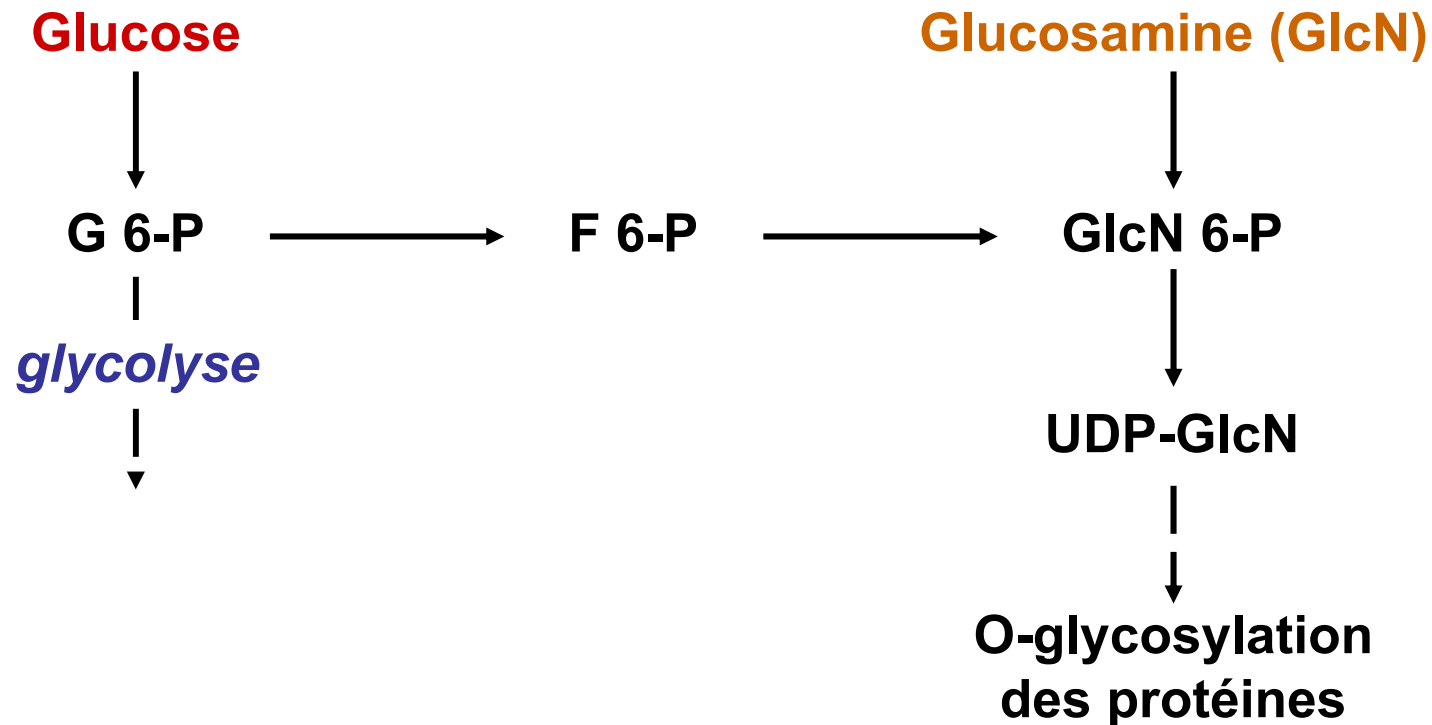
**AR** : Aldolase Reductase    **SDH** : sorbitol Deshydrogenase

# Activation des hexosamines

## En période hyperglycémique

L'excès d'héxosamines favorise la transcription des gènes des facteurs de croissance par **N-acétyl-glucosaminylation**

Principalement le VEGF, facteur proangiogénique et de perméabilité capillaire



Rôle central dans la rétinopathie proliférante (prolifération de néovaisseaux)

# Activation des PKC

## En période hyperglycémique

Activation liée principalement à l'augmentation de la formation de DAG (DiAcylGlycérol), activateur de PKC, à partir des phosphatidyl inositol membranaire

Voies d'activation associées aux PKCs → stress oxydant - AGE - VEGF

## Conséquences :

- augmentation de la perméabilité vasculaire
- augmentation de l'endothéline
- diminution du NO responsables d'une diminution du flux sanguin rétinien (ischémie),
- augmentation de l'angiogenèse et de la croissance cellulaire
- Inhibition de la réponse métabolique induite par l'insuline

Impliquées dans la **rétinopathie**, la **néphropathie** et la **neuropathie**

# **AGEs ( Produits de Glycation avancée )**

- **Impliqués dans les complications microvasculaires du diabétique**
- **Ils sont la conséquence de l'HYPERGLYCEMIE**
- **Ils sont formés par des réactions non-enzymatiques entre les groupements aminés des protéines et le glucose ou un de ses dérivés**
  - **Inducteurs hors de la cellule : GLUCOSE ; FRUCTOSE**
  - **Inducteurs intracellulaire : dérivés carbonyles du glucose**
    - **3-DEOXY GLUCOSONE (décomposition des produits d'Amadori)**
    - **GLYOXAL (auto-oxydation du glucose)**
    - **METHYL GLYOXAL (Fragmentation du Glycéraldéhyde 3-P et DHAP)**

# Glycation non enzymatique des protéines

Réaction de Maillard in vivo qui conduit à la formation des produits avancés de la glycation (AGEs)

Produits précoces de la glycation



Produits intermédiaires de la glycation

Transformation

(1,3 ou 4)-Deoxyglucosone

Produits avancés (terminaux) de la glycation

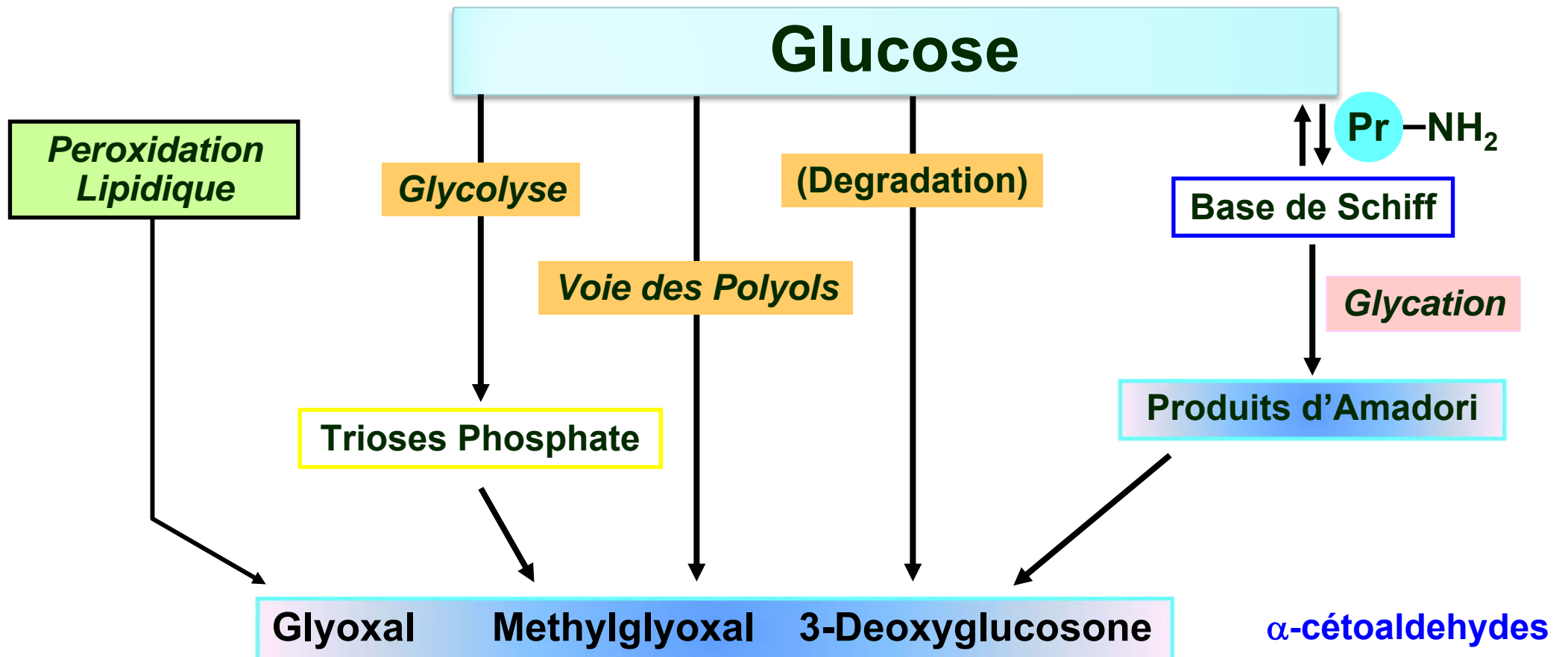
CML

Pyrraline

➔ Phase de propagation de la glycation

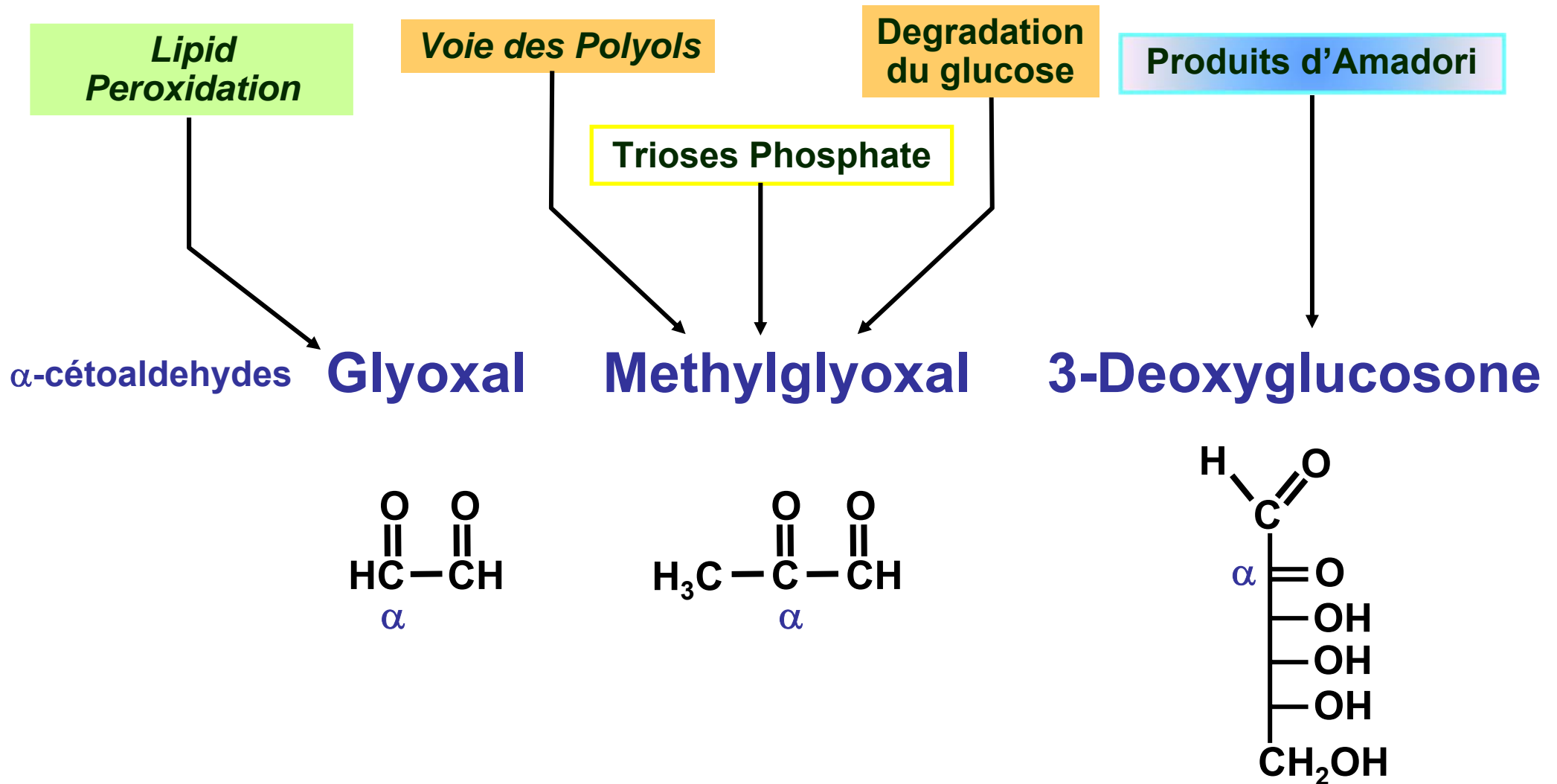
# Glycation: produits intermédiaires

**Produits intermédiaires de la glycation** : aldéhydes réactifs



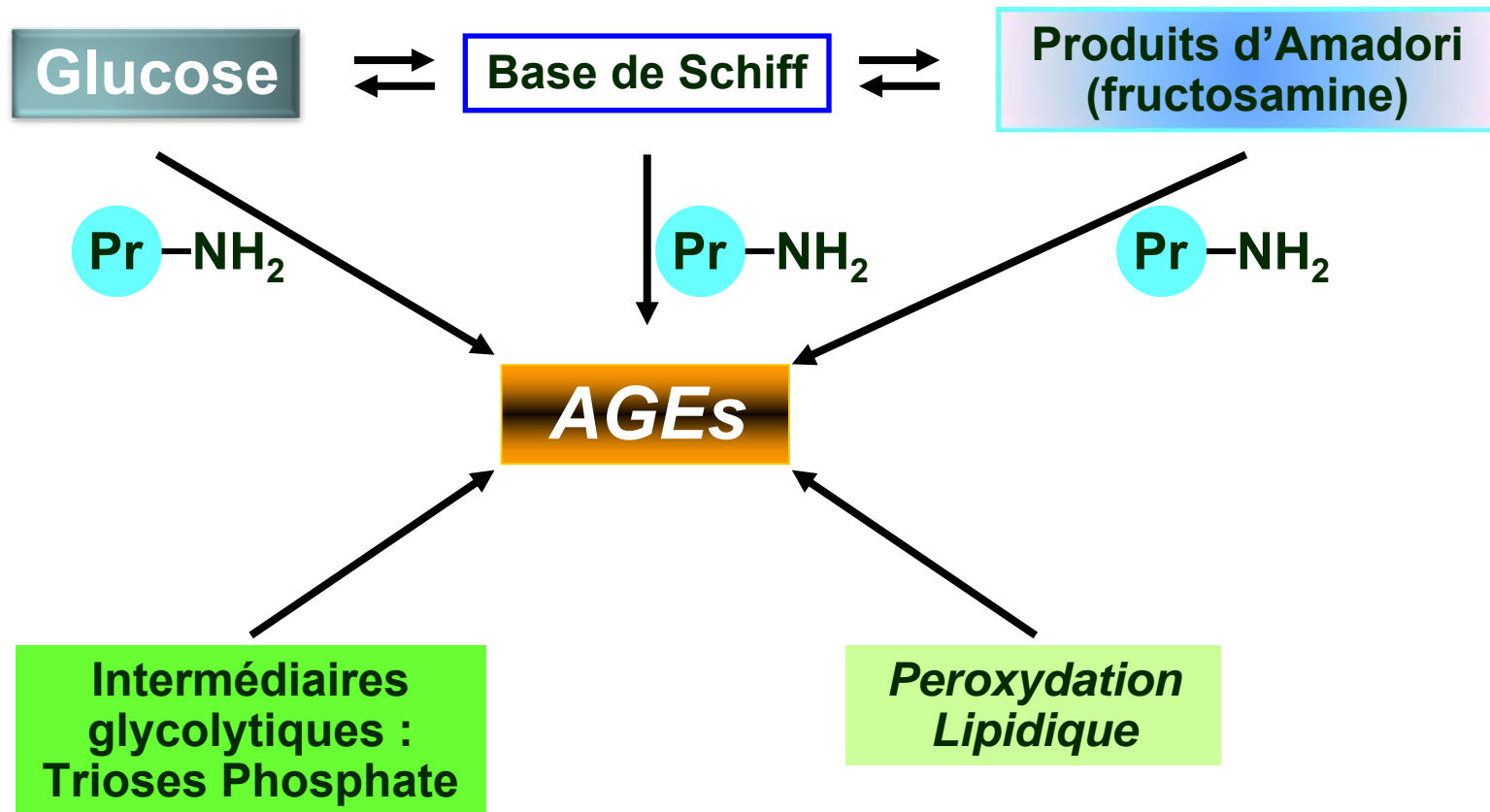
# Glycation: produits intermédiaires

**Produits intermédiaires de la glycation** : aldéhydes réactifs



# Glycation: Produits avancés de glycation

## Produits avancés de la glycation



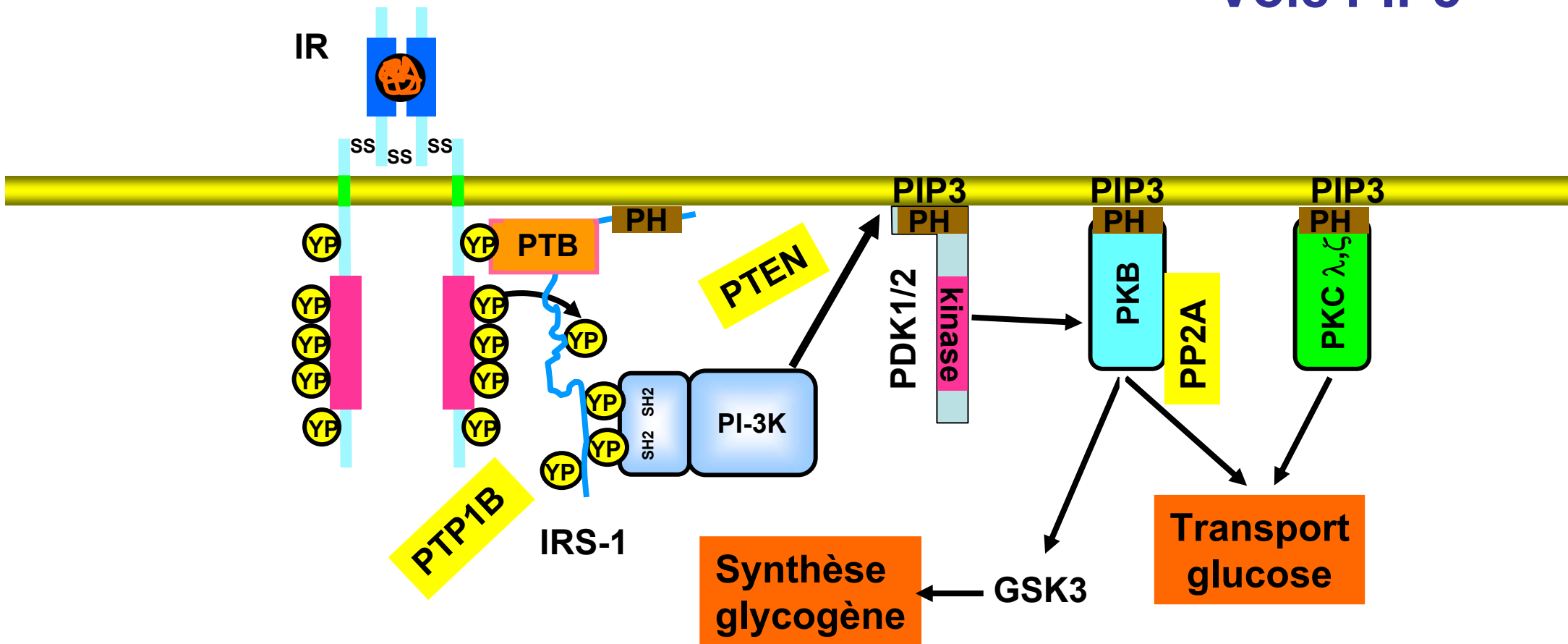
## stress oxydant / Diabète

**Voie métabolique obligatoire impliquée très précocement dans l'évolution du diabète et responsable de l'ensemble des complications par interaction avec les autres voies.**

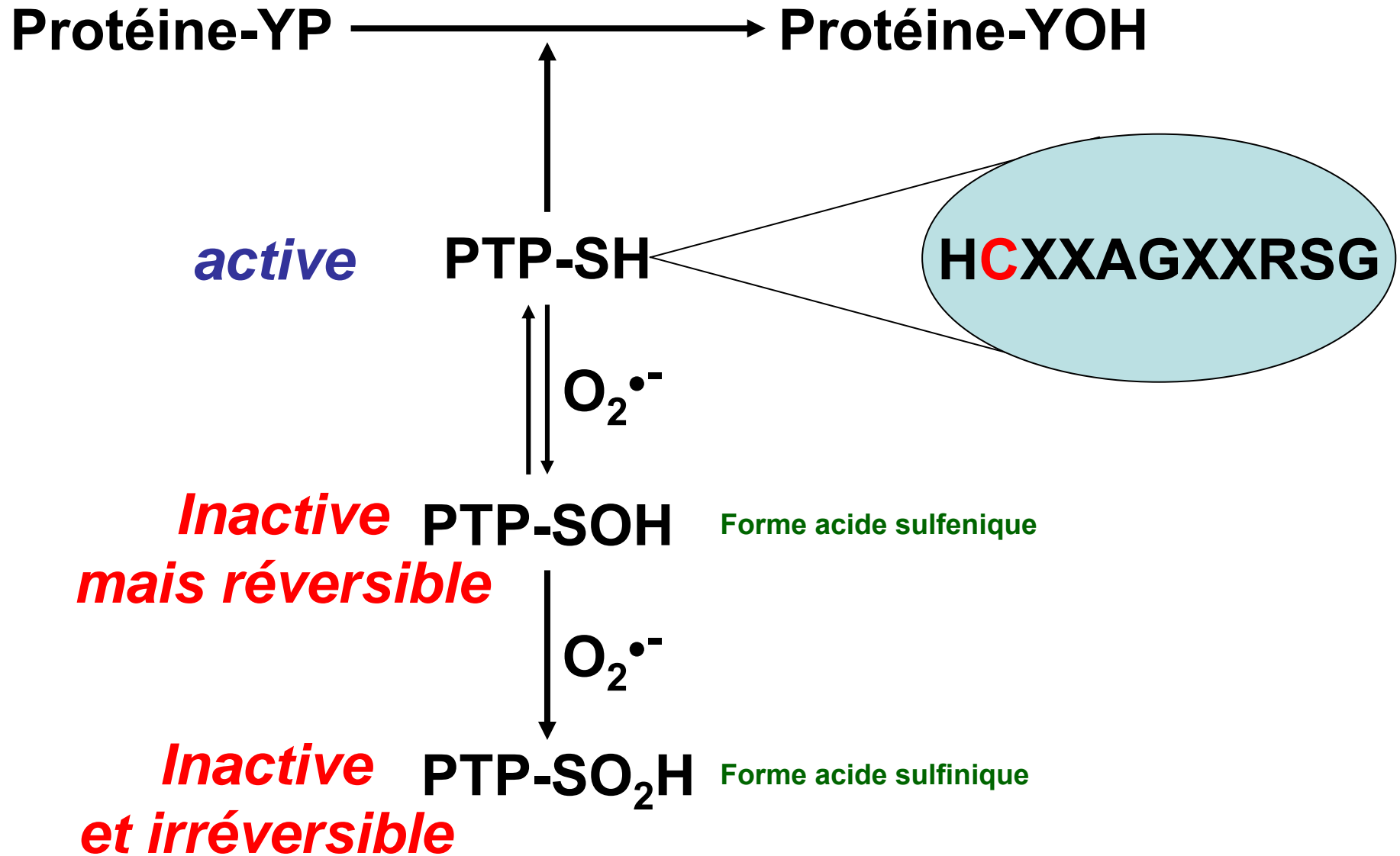
hypothèse unifiante de *Brownlee (Nature 2001)*

# ERO et action l'insuline

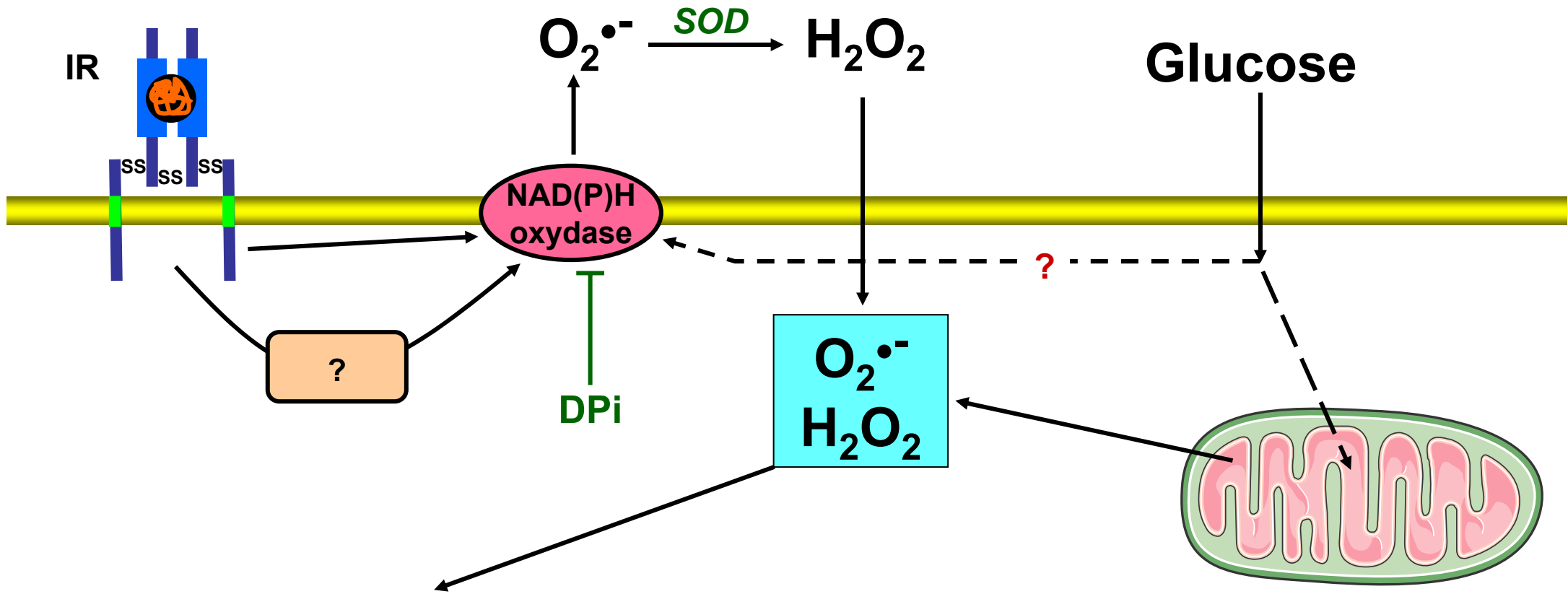
## Voie PIP3



# ERO et action l'insuline



# ERO et action l'insuline

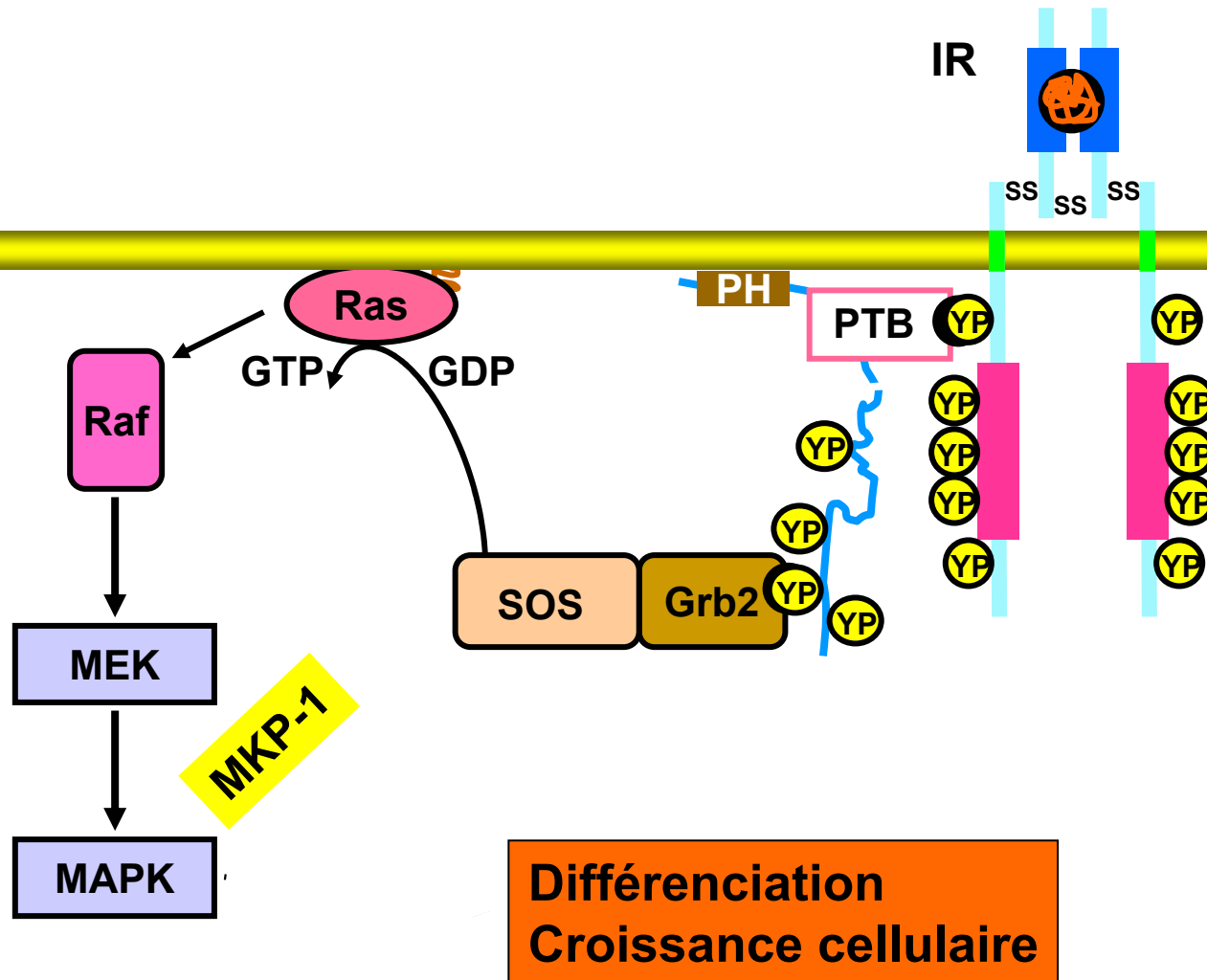


Inhibition des PTPases  
ou autre(s) intervenant(s) thiol → ↑ de YP de IR et IRS  
(48% et 43%)

**AUGMENTATION DE LA REPONSE BIOLOGIQUE**

# ERO et action l'insuline

## Voie MAPK



# ERO et résistance à l'insuline (1/2)

## ERO médiateurs cellulaires

ERO sont des médiateurs cellulaires qui activent de nombreuses voies sensibles au stress oxydant → dommages cellulaires

Certaines de ces voies sont impliquées dans ↑ de la RI

**Voie de NFκB** impliquée dans la réponse immunitaire, l'inflammation et l'apoptose

**NFκB** → régule un grand nombre de gènes dont plusieurs associés aux complications du diabète (VEGF; RAGE)

Activation de **NFκB** → induit des phosphorylation sur ser → protéasome

Activation de **NFκB** → activation de PKC, augmentation des AGEs

# ERO et resistance à l'insuline (2/2)

## ERO médiateurs cellulaires

**Voie de Jnk** super famille des MAPKinases; **Jnk / P38** → kinases du stress

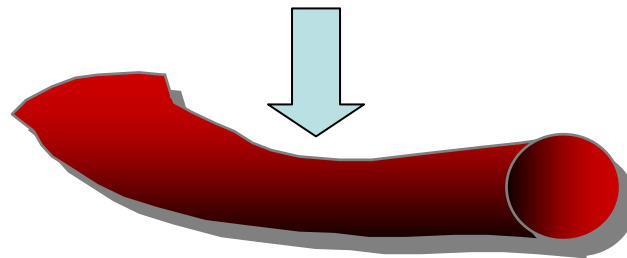
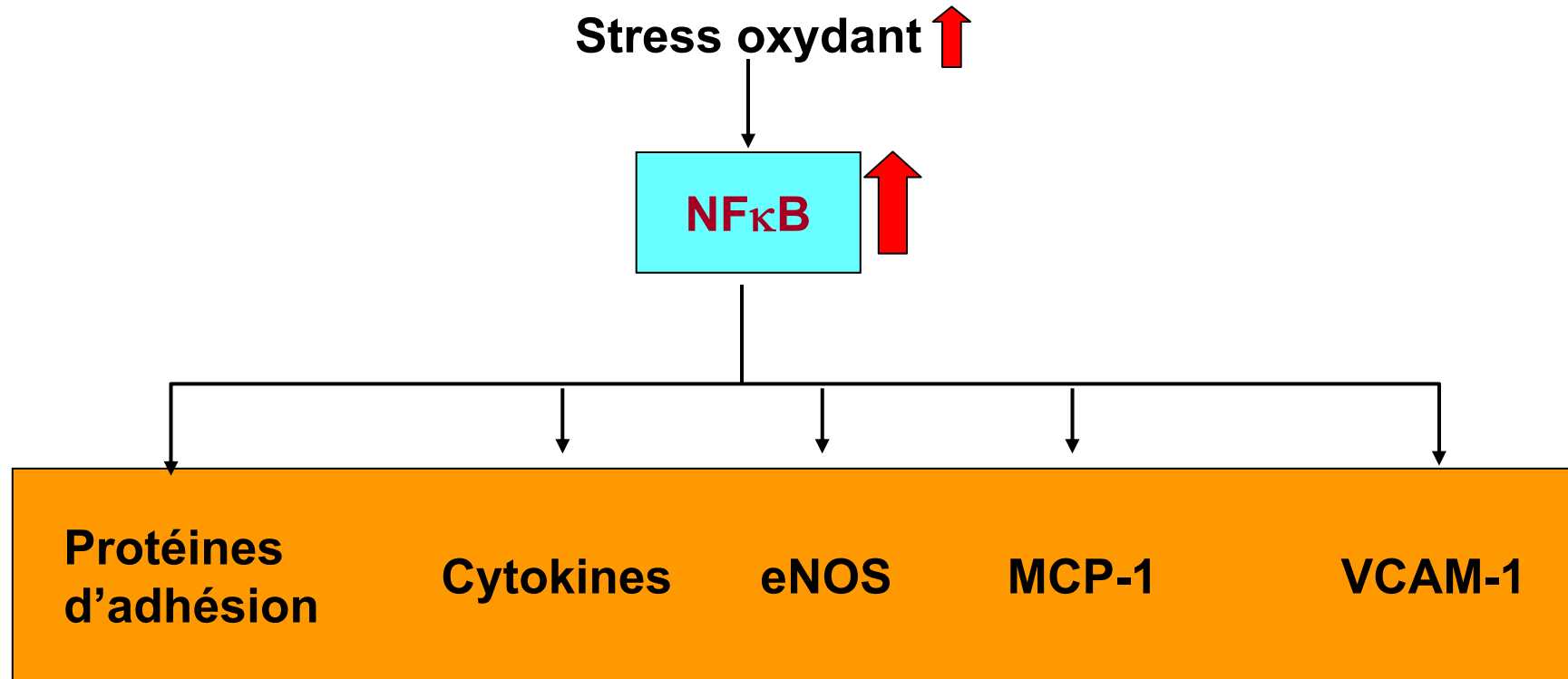
**Jnk activées** par stress endogène / exogène ; choc osmotique, cytokines proinflammatoires

**Jnk activées** → apoptose

**Voie de P38** super famille des MAPKinases; **Jnk / P38** → kinases du stress

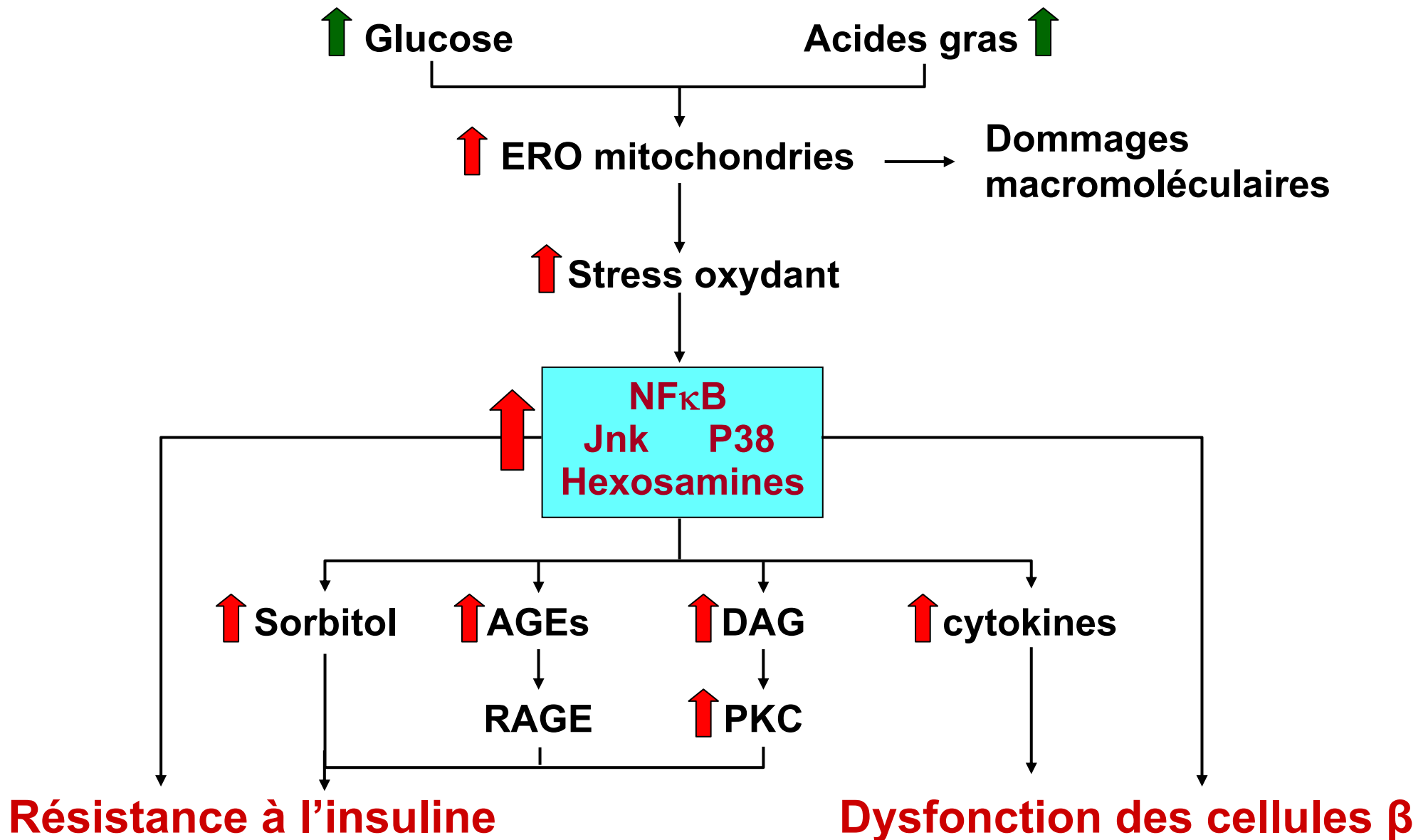
**P38 activées** hyperglycémie; diabète

# ERO action de NF $\kappa$ B (monocyte)

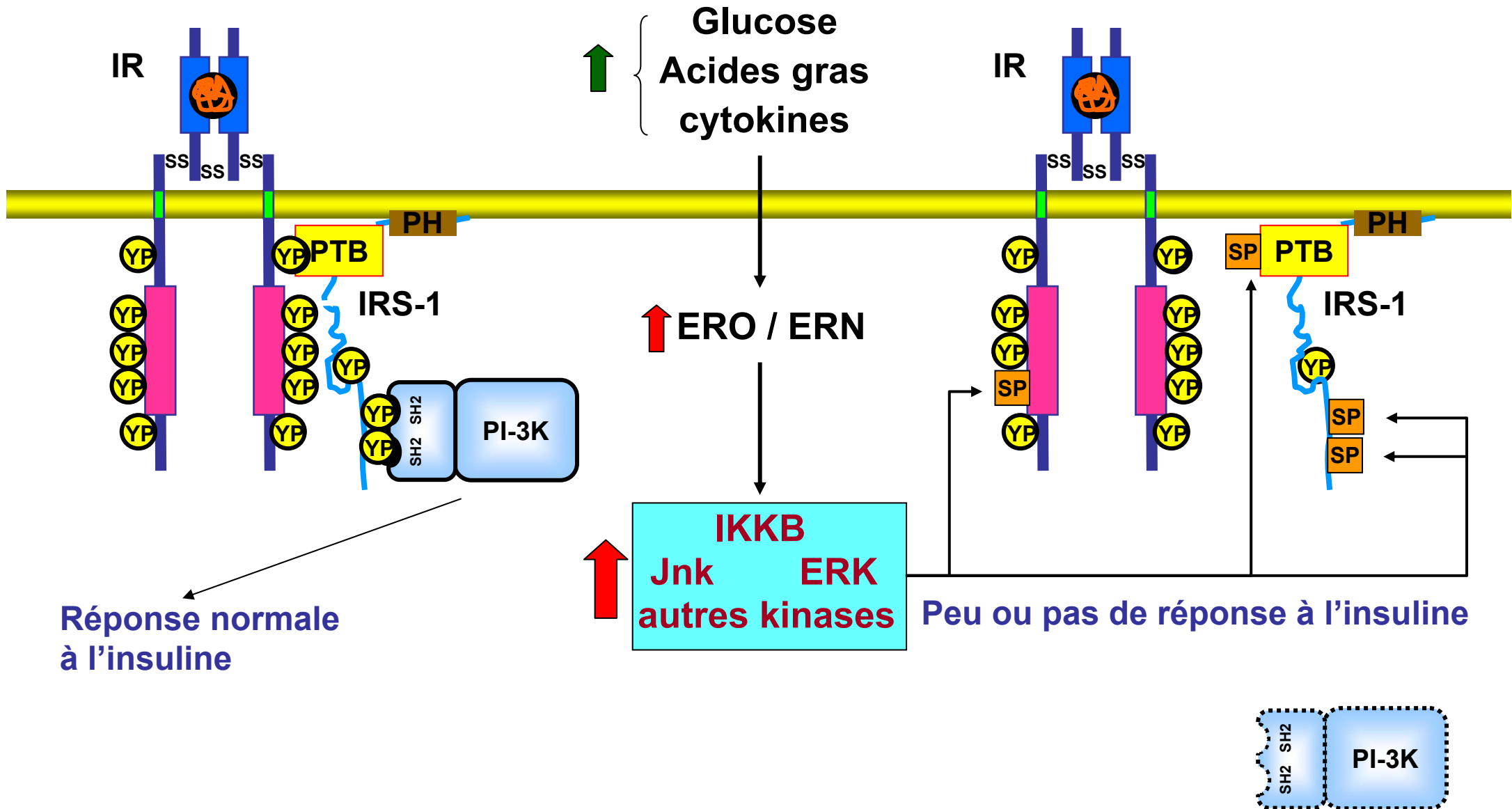


**REMODELAGE VASCULAIRE**

# ERO et résistance à l'insuline



# ERO et résistance à l'insuline



# CASCADE D'ÉVÉNEMENTS MÉTABOLIQUES

**HYPERGLYCEMIE**

**VOIE DES POLYOLS ↑**

**NADH/NAD<sup>+</sup> ↑**

**Na/K ATPase ↓**

**DAG ↑**

**PKC ↑**

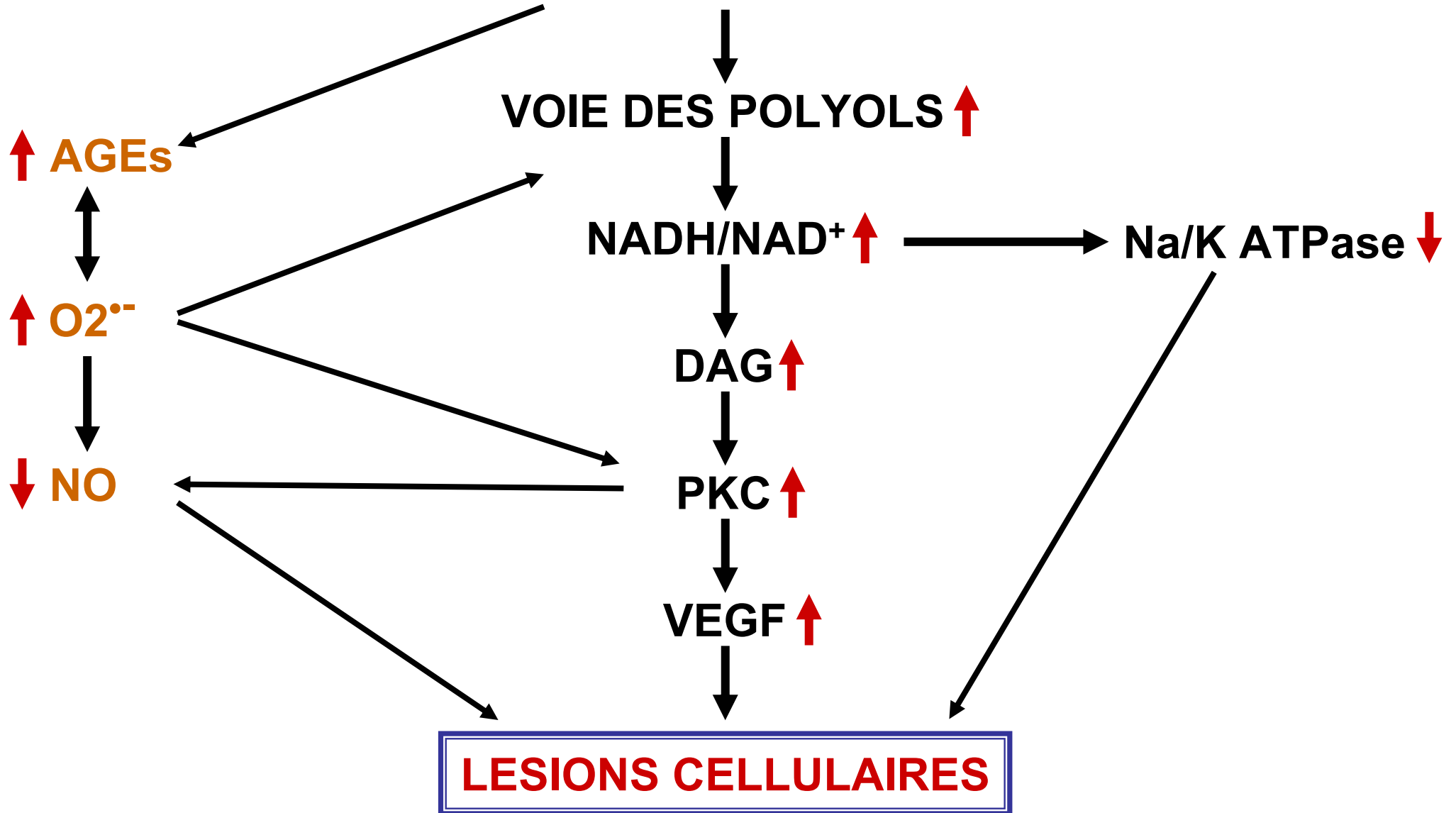
**VEGF ↑**

**↑ AGEs**

**↑ O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**

**↓ NO**

**LESIONS CELLULAIRES**



# CONCLUSIONS

- La connaissance des **mécanismes moléculaires liés à l'hyperglycémie chronique et impliqués dans les complications dégénératives** ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques
- Les **voies d'altération glycémique** alimentent la production radicalaire mitochondriale, responsable du **stress oxydant**



***La recherche s'oriente vers des thérapeutiques ayant une action synergique sur toutes les voies ou luttant contre le stress oxydant***

# Biologie moléculaire et régulation de la communication cellulaire

## Aspects fondamentaux et cliniques

### Méthodes et outils d'étude du métabolisme

Introduction à la communication et à la signalisation cellulaire	J. Giudicelli	3 h	13 mars
--	---------------	-----	---------

### Les voies de signalisation et de transduction des signaux

Grandes voies de signalisation médiées par l'insuline / résistance à l'insuline	J. Giudicelli	3 h	20 mars
---	---------------	-----	---------

### Homéostasie du glucose/ métabolisme lipidique/ Pathologies associées

Glucotoxicité (glycation / stress oxydant)	J. Giudicelli	3 h	27 mars
Acides gras nutritionnels et signalisation	P. Grimaldi	2 h	03 avril
Métabolisme des lipoprotéines / Dislipidémies	P Bayer	2 h	03 avril

### Signalisation et pathologies

Modes d'action moléculaires, fonctions biologiques, pathologies associées et nouvelles stratégies thérapeutiques	V Goffin	2 h	10 avril
Signalisation dans le tissu osseux : Applications actuelles et futures.	H Schmid-Antomarchi	2 h	10 avril
Chimiokines et cancer	A Schmid-Alliana	2 h	17 avril

### Approches méthodologiques modernes

Thérapie génique du diabète	F Suavet	2 h	24 avril
Spectrométrie de masse ; applications médicales	M Samson	2 h	24 avril

# Biologie moléculaire et régulation de la communication cellulaire

## Aspects fondamentaux et cliniques

### Voies de signalisation autres

Le contrôle génétique du "milieu intérieur chez la drosophile	P Léopold	2 h	15 mai
Voies de signalisation et mitochondries	B Sibille	2 h	15 mai

### Signalisation et nutrition

Voies de signalisation mTOR, insulino-résistance et déficience en synthèse protéique	I Satney	2 h	22 mai
Sarcopénie (à définir)	St Schneider	2 h	22 mai