

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

BC. 15/08

Université de JIJEL- Faculté des sciences
Département de biologie cellulaire et moléculaire



Mémoire

De fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme
d'étude supérieur en Biologie (DES)

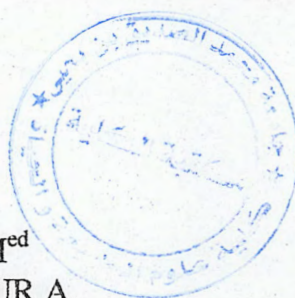
Option : BIOCHIMIE

Thème :

**La cytométrie en flux : applications dans le cas
du stress oxydatif et de l'apoptose**

Membres de jury :

Encadreur : Mr. KEBIECHE M^{ed}
Examineur : Mr. OUMDDOUR A.



Présenté par :

BELAFRITES Razika
BENHABILES Nabila
BENSAËDA Sihem

Promotion Juin 2008

Remerciement

Nous commençons par remercier Dieu de nous avoir donné le courage et la volonté pour mener ce travail à terme.

*Nous tenons à remercier notre encadreur, **KBIECHE Mohamed** à qui nous dédions toute reconnaissance et gratitude pour tous ce qu'il a fait pour nous. Nous le remercions pour ses qualités scientifiques, son humanité, sa compréhension et sa patience.*

*Nous remercions notre examinateur **OUMDDOUR A** d'avoir accepté de juger le présent travail. Nous lui sommes très reconnaissantes pour sa contribution dans l'obtention de notre diplôme.*

*Nous remercions toute personne qui nous a aidé de près ou de loin surtout **Dr, BELAFRITES A**, pour son grand soutien durant toute notre recherche.*

Enfin, merci à tous les enseignants du département de Biochimie- Microbiologie de l'université de Jijel et en particulier ceux qui nous ont transmis leur savoir durant les quatre ans.

*Benhabiles Nabila
Bensaâda Sihem
Belafrites Razika*

Liste des abréviations

μL	microlitre
μM	micromolaire
ADN	Acide Désoxyribonucléique.
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Apaf-1	Apoptosis Promoting activated factor-1
ARN	Acide Ribonucléique
Bad	Bcl-2 Antagonist of cell Death protein
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
Bal-6/7	mélange de Balanitines -6 et -7
Bax	Bcl-2 Associated x protein
Bcl-2	B cell lymphoma protein 2
Bcl-xl	Long Variant d'épissage de la protein Bcl-x
BH	Bcl-2 Homology
Bid	BH3-Interacting Domain Death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2-Interacting Metiator of cell death
BIR	Baculovirus IAP Repeat
Ca⁺⁺	Calcium
CAD	Caspase actived Dnase
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	Cystein-Aspartate protease
CCCP	Cyanure de 3-chloro-phényl hydrazone carbonyl
CD3	Cluster Differentiation 3
CD95	Cluster differentiation 95
Ced	Cell death genes
CMF	Cytométrie de flux
H₂DCF-DA	Chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate
DCF	2'7'-dichlorofluoresceine
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DÍBLO	Direct IAP binding protein with low PI
DIOC₂ (3)	3,3'-diethyloxocarbocyanate iodude
DISC	Death Inducing Singaling Complex
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Staining Assay
FADD	Fas associated protein with death domain
Fas	Fibroblast associated
FasL	Fibroblast associated Ligand
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FL	Fluorescence
FLICE	FADD-lik-ICE
FLIP	FLICE-inhibitory protein
FSC	Foward Scatter Channel
Hsp70	Heat Shock protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	Interleukin1-β converting enzyme
IL	Interleukine
IP	Iodure de Propidium

KDa	Kilo Dalton
M	Molaire
MM	Masse moléculaire
NAD⁺	Nicotine adénine dinucléotide oxydé
NADH, H⁺	Nicotine adenine dinuc léotide réduit
NADPH	Nicotine Adénine Dinucleotide Phosphate réduit
NGF	Nerve Growth Factor
NM	Nanomètre
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Phycoérythrine
PH	Potentiel d'hydrogène
PMT	Photomultiplicateur
PD	Photodiode
PS	Phosphatidyl Sérines
RING	RING finger
ROS	Espèce réactives de l'oxygène
SIDA	Syndrome d'immuno-Déficiencie Acquis
SIMP	Soluble Inter-membrane Mitochondrial protein
Smac	Second mitochondrial activator of caspases
SSC	Side Scatter Channel
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF-R1-associated protein with death domain
TRAIL	TNF Related apoptosis-Inducing Ligand
UV	Ultra-Violets
V/SVF	Versine/SVF
V/V	Volume/Volume
XIAP	X-linked IAP

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : La cytométrie de flux.....	3
1. Historique.....	3
2. Définition.....	3
3. Les composants d'un cytomètre de flux.....	3
3.1. Le système fluidique.....	4
3.2. Le système optique.....	5
a. Source d'énergie.....	5
b. Canaux optiques.....	5
c. Détecteurs.....	5
d. La fluorescence émise.....	6
3.3. Le système électronique.....	7
4. La fonction de tri.....	8
5. Les filtres optiques.....	8
6. Le principe d'application et de fonctionnement.....	9
7. Les applications de la cytométrie en flux.....	12
7.1. Immunofluorescence.....	13
7.2. Mesure du contenu en acides nucléiques.....	13
7.3. Analyse de fonctions cellulaires.....	14
Chapitre II : Le stress oxydatif et l'apoptose.....	15
A. Le stress oxydatif.....	15
1. Définition des radicaux libres.....	15
2. Définition du stress oxydatif.....	15
3. Le mécanisme pro-oxydant.....	15
4. Les principaux espèces activés de l'oxygène (ROS).....	17
5. Les sources des ROS.....	17
5.1. Les sources exogènes.....	17
5.2. Les sources endogènes.....	17
5.2.1. L'autooxydation des petites molécules.....	18
5.2.2. La xanthine oxydase.....	18
5.2.3. La NADPH oxydase.....	18
5.2.4. Le reticulum endoplasmique lisse (REL).....	18
5.2.5. La NO synthase.....	18
5.2.6. Les peroxyosomes.....	19
5.2.7. La mitochondrie.....	19
5.2.8. Le noyau.....	19
5.2.9. Les ions métalliques.....	19
6. Les dégâts du stress oxydatif.....	20
7. Les mécanismes antioxydants.....	23
7.1. Les systèmes de défense enzymatique.....	23
7.1.1. Les superoxydes dismutases.....	24

7.1.2. Les catalases.....	24
7.1.3. Les glutathions peroxydases.....	24
7.2. Les systèmes de défense non enzymatique.....	25
8. Les marqueurs biologiques du stress oxydatif.....	26
8.1. Mesure des radicaux libres.....	26
8.2. Mesure des systèmes antioxydants.....	27
8.2.1. Systèmes enzymatiques.....	27
8.2.2. Systèmes non enzymatiques.....	28
8.3. Mesure des désordres cellulaires liés au stress oxydatif.....	28
8.3.1. Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	28
8.3.2. Marqueurs d'ADN.....	28
8.3.3. Les marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés.....	29
9. Le rôle physiologique des ROS.....	29
B. L'apoptose.....	30
1. Définition.....	30
2. Apoptose et nécrose.....	30
3. Rôles physiologiques de l'apoptose.....	30
4. Aspects pathologiques de l'apoptose.....	31
5. Les phases de l'apoptose.....	31
5.1. La phase d'induction.....	31
5.2. La phase d'exécution.....	31
5.3. La phase de dégradation.....	31
6. Les effecteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose.....	32
6.1. Les caspase.....	32
6.2. Les protéines de la famille de Bcl-2.....	33
6.3. Les protéines de choc thermique.....	33
7. Les différentes voies de l'apoptose.....	33
a. La voie mitochondriale ou intrinsèque.....	34
b. La voie de récepteurs de mort ou extrinsèque.....	35
8. Les protéines inhibitrices de l'apoptose.....	36
9. L'apoptose et cancer.....	37
Chapitre III : Cytométrie, stress oxydatif et apoptose.....	38
1. Applications de la cytométrie en flux dans le cas du stress oxydatif.....	38
1.1. Mesure des espèces radicalaires de l'oxygène.....	38
1.2. Mesure de la peroxydation lipidique.....	39
2. Dans le cas de l'apoptose.....	41
2.1. Mesure de la fragmentation de l'ADN.....	41
2.2. Détection des phosphatidylsérines.....	43
2.3. Mesure de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax.....	44
2.4. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondriale.....	45
2.5. Détection des récepteurs membranaires.....	46
2.6. Détection des récepteurs TRAIL-R.....	46
Conclusion.....	47

La liste des figures et des tableaux

Fig. 1 : Focalisation de l'encre portée en fonction de la position de la source d'aspiration.....	4
Fig. 2 : Fuites de fluorescence de fluorochrome	6
Fig. 3 : Mesure de l'impulsion	7
Fig. 4 : Les différents filtres optiques	9
Fig. 5 : Schéma de principe de l'analyse par cytométrie en flux	11
Fig.6 : L'alignement lasers	12
Fig. 7 : Le déséquilibre redox en faveur des oxydants.....	16
Fig. 8 : Les principales sources cellulaires des radicaux libres	20
Fig. 9 : Les principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires conséquence d'un stress oxydatif.....	22
Fig. 10 : La voie de la peroxydation lipidique et son effet sur l'ADN	22
Fig. 11: Systèmes biologiques de défenses antioxydantes).....	23
Fig. 12: Les phases de l'apoptose mitochondriales	32
Fig. 13 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose	36
Fig. 14 : Mécanisme d'action du 2',7'- dichlorohydrofluorescéine (HDCF-DA)	38
Fig. 15 : Formules chimiques du 5(6)-DCFDA avant et après hydrolyse par les estérases	39
Fig. 16 : Structure chimiques des tocophérols,des tocotriéonols et du trolox.....	40
Fig. 17 : Structure chimique des dérivés lipophiles (a) et phospholipidiques (b) de....	41
Fig. 18 : Structure chimique de l'iodure de propidium.....	42
Fig. 19 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	42
Fig. 20 : Externalisation des phosphatidylsérines au cours de l'initiation de l'apoptose.	43
Fig. 21: Analyse de l'expression des récepteurs de TRAIL au niveau des cellules U-87 MG par cytométrie en flux	46

Tableau 01 : Les principaux espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	16
Tableau 02 : Les enzymes de détoxications et les réactions catalysées.....	25

Introduction

Introduction

La vie moderne nous confronte toutefois à la pollution, à l'exposition prolongée au soleil et à différentes radiations, à l'absorption d'alcool ou de médicaments, au tabagisme qui sont autant de situations qui provoquent des modifications au sein des cellules vivantes telles que : le stress oxydatif, vieillissement, apoptose, nécrose

L'oxygène, qui est essentiel pour plusieurs fonctions physiologiques, il peut être toxique et mène à la production des espèces oxygénées activées (ROS). Si la production des ROS est suffisamment importante, cela conduit à un état de stress oxydatif, qu'est un déséquilibre prononcé entre les éléments antioxydants et oxydant en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes (Sies, 1991).

Une fois formées, les ROS peuvent engendrer des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques (protéines, enzymes, ADN, lipides, glucides...). Afin que les ROS n'exercent pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense intracellulaire, membranaire ou extracellulaire (Pincemail, 2001).

Les ROS participent également dans le contrôle de l'équilibre cellulaire, en modulant la prolifération, la différenciation, et agissent comme médiateurs dans les voies de signalisation de l'apoptose (Fleury et al., 2002 ; Kamata and Hirata, 1999 ; Murrell et al., 1990).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée, correspond à une réaction de l'organisme à différents stimuli (physiologiques ou pathologique). Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé (voie intrinsèque ou extrinsèque) qui va induire la destruction d'une cellule toute en préservant l'intégrité tissulaire environnante (Kerr et al., 1972). Elle joue un rôle capital dans l'oncogénèse, dans la dégradation des espaces interdigitaux et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. La régulation du processus apoptotique implique des protéine pro-apoptotique (famille des caspases) et des protéines anti-apoptotiques telles que la famille des IAP (inhibitors of apoptosis protein) (Johnstone et al., 2002). Le contrôle des mécanismes de l'apoptose est sous la dépendance de voies très conservées dont la dérégulation peut être à l'origine de nombreuses maladies (maladies neuro-dégénératives, cancer...) (Deveraux and Reed, 1999).

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur les techniques modernes d'évaluation du stress oxydatif et de l'apoptose, en raison d'apprécier leurs effets pathologiques. En effet, le stress oxydatif peut être évalué par la mesure de la production des ROS, le statut antioxydant ou par la mesure des altérations biochimiques produites lors des agressions des biomolécules par les radicaux libres. Pour cela, maintes méthodes sont considérées actuellement, à savoir les méthodes enzymatiques, méthodes fluorométriques, colorimétriques... Quant à l'évaluation de l'apoptose, les dosages enzymatiques et biochimiques et les tests immunologiques sont amplement en vigueur.

Ces dernières années l'apparition de la cytométrie en flux comme technique d'analyse et de tri dérive des appareils de numération cellulaires est adoptée par plusieurs laboratoires de recherche à travers le monde comme méthode additionnelle ou de remplacement à des méthodes traditionnelles pour l'évaluation des éléments cellulaires

ou subcellulaires. En effet, cette technique permet de faire simultanément l'analyse quantitatives de plusieurs paramètres sur des éléments en suspension : Cellules, levure, bactéries ou constituants cellulaires (noyaux, mitochondries, ADN, anticorps,...), ainsi que la quantification des diverses molécules chimiques ou biochimiques se basant sur la fluorescence émise par ces substances.

A la lumière de ce que se dit sur la cytométrie en flux, et en plus d'une étude approfondie sur l'homéostasie redox et les mécanismes biochimiques et physiologiques de l'apoptose, nous allons étudier la méthodologie d'application de cette technique dans l'évaluation à la fois du stress oxydatif et de l'apoptose en suivant la démarche pédagogique suivante :

- ❖ Comprendre l'appareillage et les différentes applications de la cytométrie de flux dans les différents domaines d'études cellulaires et moléculaires.
- ❖ Connaître le stress oxydatif, son origine, ses caractéristiques physiologiques et pathologiques ainsi que ses biomarqueurs d'évaluation.
- ❖ Connaître l'apoptose, ses inducteurs moléculaires et son rôle physiologique et impact pathologique.
- ❖ Méthodologie d'évaluation du stress oxydatif et apoptose par cytométrie en flux.

Analyse
bibliographique

Chapitre I

I. La cytométrie de flux

1. Historique

Les origines de la cytométrie en flux (CMF) sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan à Montréal conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photoélectrique. Cette découverte fera l'objet d'une publication dans la prestigieuse revue science (Moldavan, 1934). En 1949, W. Coulter a mis au point un appareil permettant de compter des cellules et de mesurer leur taille par variation de résistivité du courant liquidien (Coulter, 1956). En 1965, Kamensky permet une avancée supplémentaire en permettant l'analyse des constituants cellulaires (Kamensky et al., 1965).

Dan Villa en 1969, utilise le laser comme source lumineuse car il permet une meilleure focalisation du faisceau, une grande puissance d'excitation, et une stabilité du chromatisme.

Dans les années 70, les chercheurs des laboratoires de Los Alamos et de Stanfor associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules, entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires. Le développement simultané d'appareillages commercialisés polyvalents et l'apparition des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux a conduit à une explosion des activités impliquant la CMF. L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto-fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en oeuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes.

2. Définition de la cytométrie

La CMF est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide (Mezioud et al., 2006). C'est une technique non destructrice permet le comptage dynamique et le triage éventuel de cellules d'après leurs caractéristiques physiques et granulométriques. Elle permet la caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules ou de cellules en suspension dans un liquide.

On peut ainsi mesurer de nombreuses caractéristiques telles que la taille, la réfringence et tout composant ou fonction qui peut être détecté par une seconde fluorescente qui se lie spécifiquement à la cellule (Gutensohn and Kuehnl., 1998 ; Garatty and Arnat, 1995).

Les cellules en suspension défilent dans une gaine liquide devant un faisceau laser une à une. Elles émettent alors des informations lumineuses séparées par un réseau optique et dirigées vers des photomultiplicateurs qui les amplifient et les transforment en signaux électroniques. Les résultats de l'analyse apparaissent sous forme d'histogramme (intensité relative d'un signal en fonction du nombre d'évènements) ou de cytogrammes (corrélations de paramètres deux à deux).

3. Les composants d'un cytomètre en flux

Pour fonctionner un cytomètre en flux nécessite une combinaison de :

- **Fluidique** : pour introduire et canaliser les cellules.
- **Optique** : une source d'excitation et de récupération des signaux.
- **Electronique** : pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur (Mezioud et al., 2006). Pour certains appareils, il existe en plus une fonction de tri (Jacquet, 2000).

3.1. Le système fluidique

La suspension cellulaire peut être aspirée ou exposée à une surpression injectée au centre de la veine liquide d'entraînement (Mezioud et al., 2006), à l'aide d'une aiguille métallique dont le diamètre interne est finement calibré.

La veine liquide stable s'écoule à vitesse constante à l'intérieur d'un tube en plastique ou un tyon sous l'effet de la pression. Le conduit contenant le liquide se termine par une buse de section étroite dont l'orifice est calibré avec grande précision. Le rapport des pressions imprimées à l'échantillon d'une part et au liquide entraîneur d'autre part détermine la vitesse de défilement des particules (Jacquet., 2000).

L'orifice dans lequel passent les cellules peut être de 30 à 100 μm de diamètre intérieur. Cependant, il n'y a pas de mélange entre le liquide de gaine et la suspension cellulaire: il s'agit d'un flux laminaire qui peut avoir un débit de 500 à plus de 50000 événements par seconde, l'espace entre chaque cellule étant inférieur à 1 mm (Mezioud et al. 2006).

Focalisation hydronomique

Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux (Fig. 1). Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet. Cependant, de nouveaux cytomètres remplacent le système fluidique par un système d'aspiration capillaire, s'affranchissant ainsi des problèmes de focalisation hydronomique (Mezioud et al., 2006).

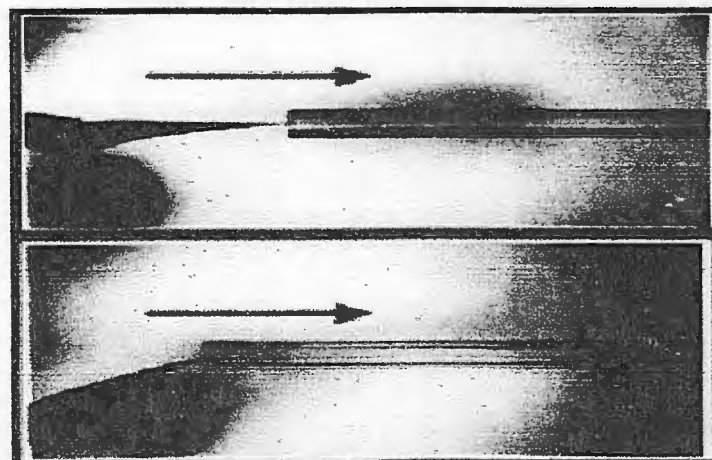


Fig. 1 : Focalisation de l'encre portée en fonction de la position de la source d'aspiration (Mezioud et al., 2006).

3.2. Le système optique

a. Source d'énergie

Il est nécessaire de focaliser une source lumineuse sur les cellules qui doit permettre une illumination des colorants à une longueur d'onde proche de leur maximum d'excitation.

Deux types de sources sont actuellement utilisés

- **Les lasers** (les plus fréquemment utilisés) qui présentent un grand nombre d'avantages: puissance, stabilité, finesse du faisceau. Les lasers ont des spectres d'émission discontinus. Il existe différents lasers: par exemple, les lasers à ions d'argon permettant d'exciter entre autres la fluorescéine, la phycoérythrine, l'iodure de propidium à 488nm ainsi que l'U.V. La présence de plusieurs lasers de types différents permet de multiplier le nombre de fluorochrome aux caractéristiques spectrales différentes.

- **Les lampes à vapeur de mercure ou au xénon** sont aussi utilisées. La focalisation est moindre que dans le cas du laser, mais le spectre est assez large et leur coût est limité (Mezioud et al., 2006).

b)- canaux optiques

Ils correspondent au trajet suivi par la lumière du volume d'illumination aux détecteurs. Il existe trois types de canaux:

- Canal "taille" (FSC "Foward Scatter channel")
- Canal "structure" (SSC "Side Scatter Channel")
- Canal "fluorescence" (FL1, FL2, FL3...)

Les différents signaux optiques émis par la cellule doivent être focalisés, séparés, puis acheminés vers des systèmes de détection, photomultiplicateurs ou photodiodes. Ils sont pour cela, sélectionnés par différents circuits optiques composés d'une alternance de miroirs dichroïques et de filtres.

En générale, des détecteurs multiples sont utilisés simultanément pour étudier les paramètres de diffusion (FSC, SSC) et de fluorescence. Ainsi, l'analyse des différents canaux dépend des propriétés spectrales des fluorochromes utilisés, de l'ordre et des caractéristiques des filtres (Mezioud et al., 2006).

c)- Détecteurs

Après avoir traversé cette succession de miroirs et de filtres, la lumière est recueillie et transformée en signal électrique par un photomultiplicateur **PMT** (plus sensible et utilisé pour les signaux faibles: fluorescence / structure) ou une photodiode **PD** (sensible plus faible, utilisé pour les signaux forts / taille). Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires (Mezioud et al. 2006).

d)- La fluorescence émise

Cette fluorescence peut être spontanée, mais le plus souvent, elle est apportée à la cellule par un fluorochrome. Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et ré-émet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de chaleur, émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée. Il existe un grand panel de fluorochromes qui a des longueurs d'ondes d'émission et d'excitation qui leur sont propres. Cependant, les spectres de certains d'entre eux se chevauchent ce qui nécessite des compensations afin de soustraire la superposition des deux signaux de fluorescence.

Ainsi, sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte par la fluorescine isothiocyanate (FITC) mais non marquée en fluorescence orange phycoérythrine (PE) est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des deux fluorescences (Fig.2).

Le système de compensation permet de soustraire artificiellement la fluorescence orange qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC dans le canal de la PE. Chaque pourcentage de compensation sera ainsi déterminé par l'analyse des cellules simplement marquées par les divers fluorochromes (Mezioud et al., 2006).

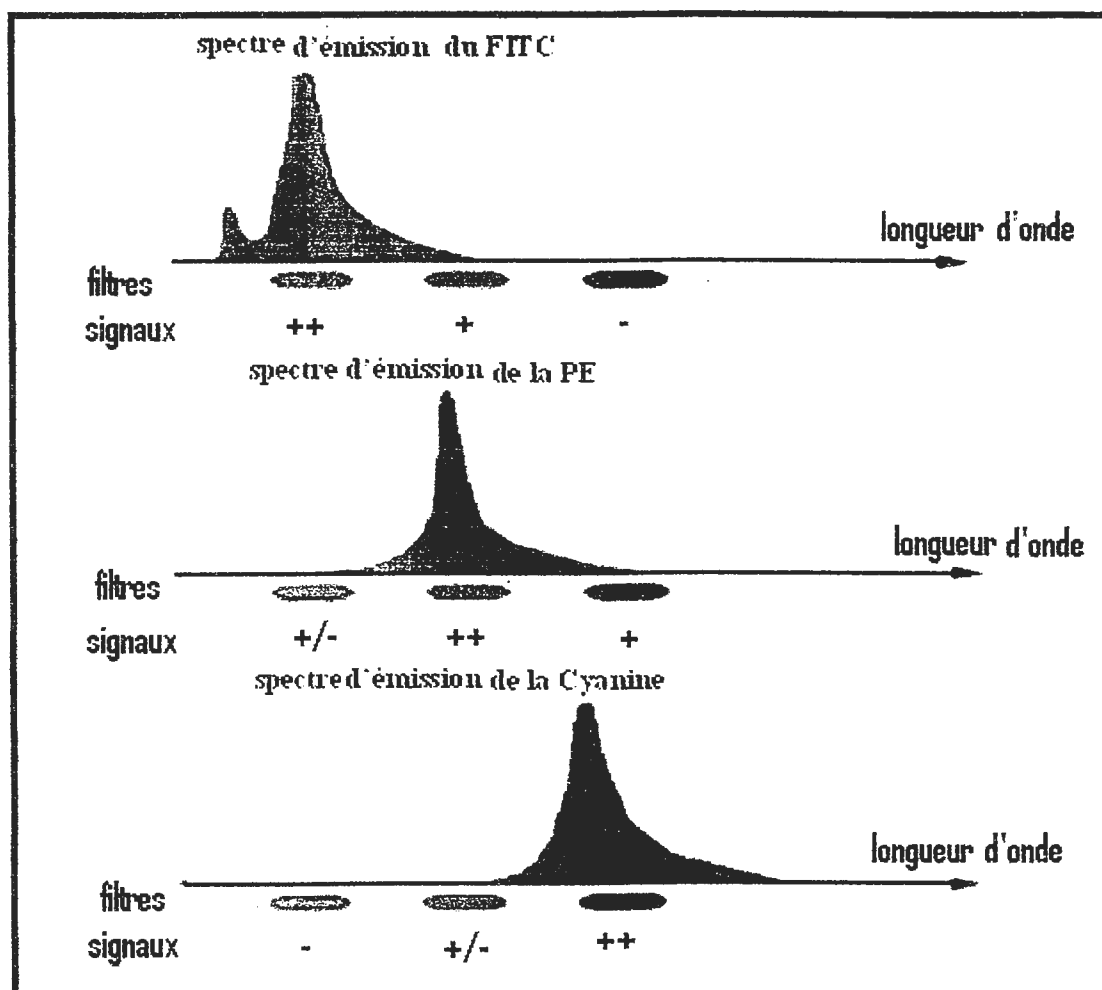


Fig. 2: Fuites de fluorescence de fluorochrome (Mezioud et al., 2006).

3.3. Le système électronique

Les signaux optiques sont convertis en signaux électriques par les PMT. Ces signaux électriques ont une valeur comprise le plus souvent entre 0 et 10 volts (signal analogique). L'ordinateur ne peut traiter ces données que si elles sont sous forme binaire (signal digital). Le rôle du convertisseur analogique-digital est de convertir, comme son nom l'indique, un signal analogique (valeur continue) en signal digital (valeur discontinue) assimilable par l'ordinateur. Il existe une conversion logarithmique (fluorescence) ou linéaire (taille et structure) (Mezioud et al., 2006).

- **La mesure de l'impulsion**

La traversée du rayon laser par une cellule génère une impulsion électrique amplifiée par un PMT (à gauche) dont l'amplitude (à droite) est à chaque instant proportionnelle à l'énergie lumineuse incidente qui varie selon une loi normale le long du diamètre du faisceau parcouru, et dont la durée est fonction du temps de la traversée « temps de vol ». Pour une valeur d'énergie incidente donnée à un instant donné du parcours, l'impulsion électrique est analogiquement proportionnelle à l'intensité du phénomène lumineux capté, à savoir un signal de diffusion ou de fluorescence. Afin d'obtenir des mesures homogènes, il faut donc réaliser celles-ci toujours au même instant choisi lorsque le signal est particulièrement net (distinct du bruit de fond) : le cytomètre à flux conventionnel mesure l'amplitude maximale de l'impulsion, atteinte lorsque la cellule franchit le centre du faisceau lumineux (fig.3).

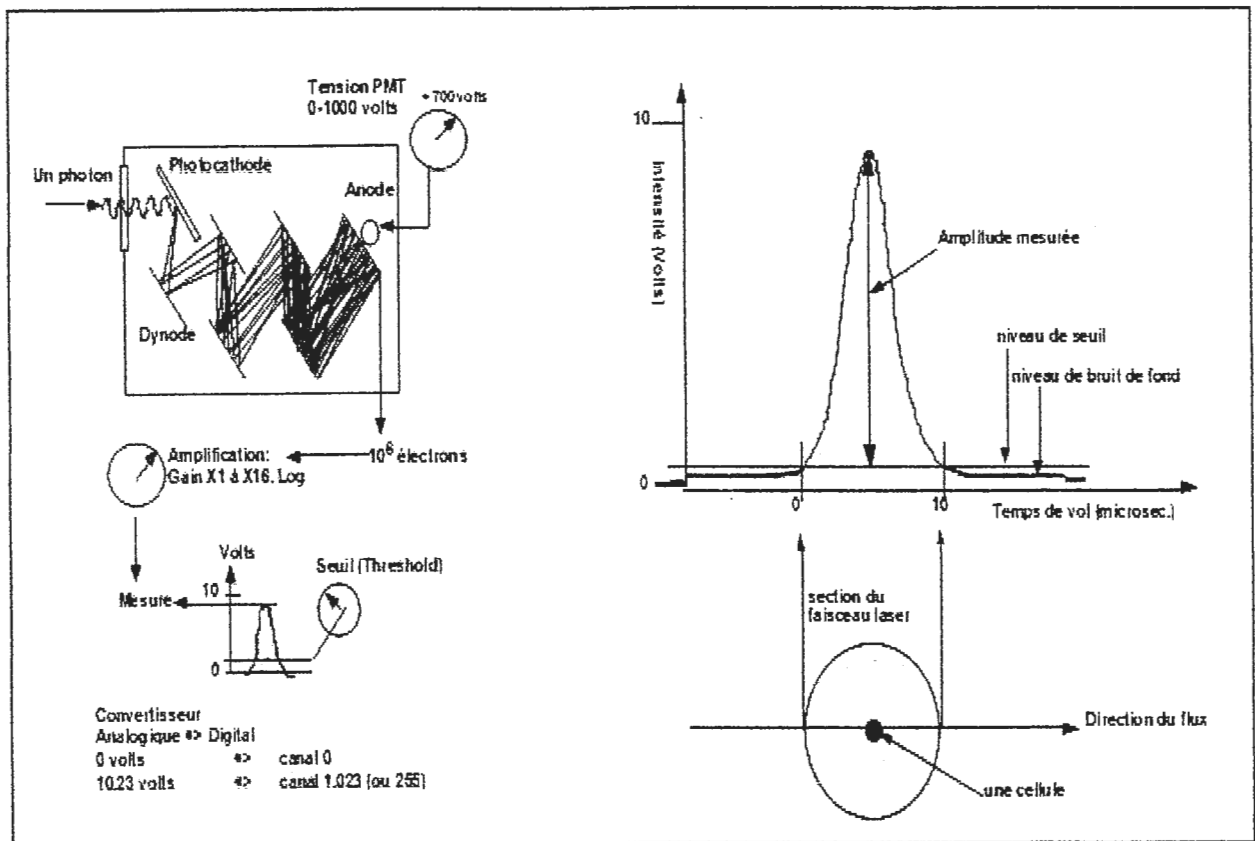


Fig. 3 : Mesure de l'impulsion (Greimers, 2002).

4. La fonction de tri

Lorsque le diamètre de la veine liquide qui s'échappe de la buse n'excède pas une certaine taille (Jacquet, 2000), la fragmentation contrôlée du flux liquide en 30.000 gouttes/s conduit à l'emprisonnement de chaque cellule dans une goutte peu après l'analyse dans un délai parfaitement connu par la machine durant lequel elle décidera de charger électrostatiquement chaque goutte contenant une seule cellule intacte et viable (Greimers, 2002).

Sur les cytogrammes, une (ou plusieurs fenêtres) de tri sélectionne (s) la (les) zone (s) d'intérêt. Les particules qui répondent à la totalité des critères de tri sélectionné sont purifiées du reste de l'échantillon quelques micro-secondes après leur analyse (Jacquet., 2000). Les gouttes chargées sont dérivées vers des flacons récolteurs (Greimers., 2002). Dans les appareils types EPICS. Chaque gouttelette qui contient un objet sélectionné reçoit une charge électrique (positive ou négative) au moment même de sa formation. Celle-ci est créée par une impulsion électrique appliquée entre deux électrodes portées chacune à un potentiel alternativement négative ou positive. Les gouttelettes chargées sont dérivées de leur trajectoire initiale sous l'influence d'un champ électrique. Le champ électrique est créé par deux plaques de réflexion portées chacune à un potentiel élevé. La déviation des gouttelettes est proportionnelle à leur charge électrostatique et à l'intensité du champ électrique. Les gouttelettes et les particules qu'elles contiennent peuvent ainsi être recueillies à l'intérieur d'un récipient. Pour le FAC Sort, le tri est réalisé à partir d'un système (en anglais « catchertube ») qui attrape les particules d'intérêt (Jacquet, 2000).

5. Les filtres optiques

L'analyse en cytométrie en flux d'une suspension de particules est possible quand l'appareil est capable de discriminer les différentes populations ou sous-populations fluorescentes.

Le choix des filtres introduit dans le système optique devant les photomultiplicateurs est donc primordial (Jacquet., 2000). Un filtre optique est une lame plane de verre, ou de matériaux plus complexe, dont le rôle est fondamental puisqu'il sélectionne la frange du spectre lumineux à transmettre, atténuer, arrêter ou dévier afin que chaque détecteur ne capte que le signal lumineux qui lui est destiné (Greimers., 2002).

Les filtres sont soit de type absorbant, soit de type interférentiel. La spécificité spectrale du filtre optique est préalablement définie par sa courbe de transmission déterminée par spectrophotométrie.

- Les filtres absorbants sont des filtres en verre coloré. Ils sont tous de type « Long pass » ou « pass haut ». Ils transmettent donc la lumière dont la longueur d'onde est supérieure à leur valeur maximale et absorbent les rayonnements de longueur d'ondes inférieurs.

- Les filtres interférentiels sont constitués par une surface de verre sur laquelle de multiples couches fines de sels métalliques sont uniformément réparties. Le domaine de réflexion et de transmission d'un filtre est lié à l'épaisseur et à l'indice de réfraction de chaque dépôt. Ces filtres transmettent ou suppriment certaines longueurs d'ondes de façon très spécifique par les phénomènes d'interférences des rayons lumineux réfléchis sur chaque couche. Ils sont de type « long pass » ou « short pass », c'est-à-dire que leur

pouvoir de transmission s'exerce sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'ondes respectivement supérieures et inférieures à la valeur nominale. Le domaine spectral spécifiquement transmis par les filtres « Band pass » se limite à une portion réduite du spectre. Placés à 45° dans le trajet du rayonnement lumineux, les filtres interférentiels se comportent en miroirs sélectifs (Jacquet, 2000). On peut classer ces filtres comme le montre la figure 4, en quatre types principaux caractérisés par un spectre de transmission, à savoir :

- Le filtre pass-haut : Transmet toute lumière au-delà d'une certaine longueur d'onde.
- Le filtre pass bas réalise l'inverse.
- Le filtre à bande-passante : est le plus utilisé et le plus sélectif d'une zone spectrale étroite.
- le filtre de densité : est un filtre neutre perméable à toute lumière mais en atténue fortement l'intensité.

Il est indispensable pour atténuer les signaux de lumière diffusée, beaucoup plus intenses que les signaux de fluorescence. Des miroirs dichroïques semi-transparents combinant ces différentes propriétés sont également utilisés dans les systèmes optiques complexes devant discriminer plusieurs lumières de fluorescence de couleur différentes et les transmettre chacune vers un détecteur particulier (Greimers., 2002). Ces miroirs sont utilisés aussi pour séparer deux rayonnements lumineux distincts issus d'une même source (Jacquet., 2000).

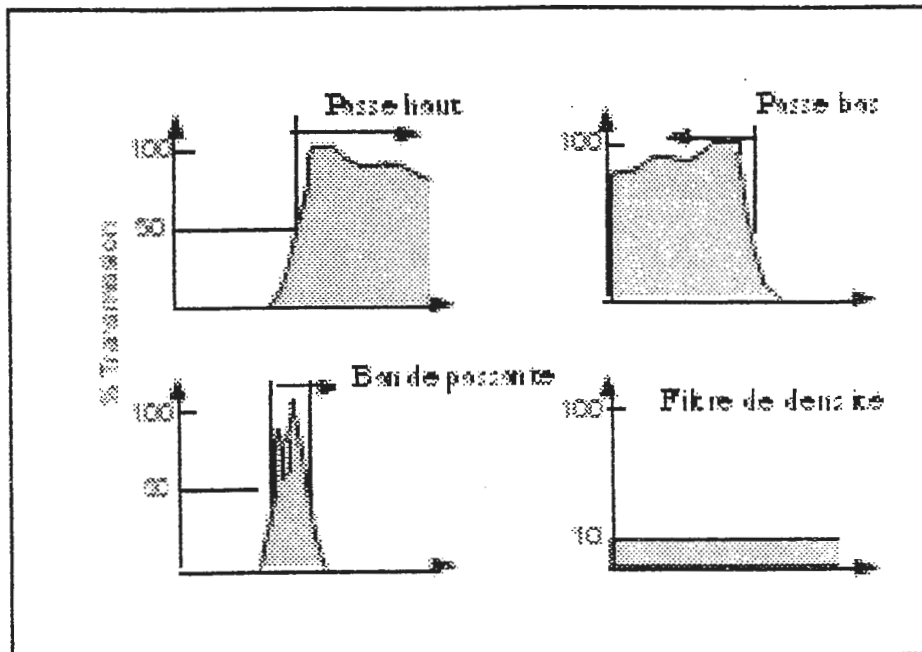


Fig. 4 : Les différents filtres optiques (Greimers, 2002).

6. Le principe d'application et de fonctionnement

Pour être analysé, la suspension cellulaire est injectée au centre d'un liquide de gaine dont l'écoulement est plus rapide. Le flux est laminaire, ce qui veut dire que les deux

liquides ne se mélangent pas et progressent chacun selon leur propre trajectoire. Il se crée ainsi une mince veine porteuse coaxiale au liquide de gaine qui contraint les cellules à adopter une progression particulière en file indienne. Le flux croise ensuite un faisceau laser qui irradie une à une pendant quelques microsecondes toutes les cellules, à la cadence moyenne de 1000 cellules par seconde. Durant cet instant chaque cellule diffuse une partie de la lumière de fluorescences en fonction des sondes fluorescentes qu'elle porte. Les signaux lumineux captés par une optique appropriée sont transmis aux détecteurs photoélectriques puis à un ordinateur qui mémorise toutes les données individuelles et dans l'ordre de passage des cellules.

Les cellules sont habituellement colorées avec un ou plusieurs colorants fluorescents spécifiques des composants cellulaires d'intérêt, par exemple, l'ADN, et la fluorescence de chaque cellule est mesurée quand elle traverse rapidement le faisceau d'excitation (laser ou lampe à arc de mercure). La fluorescence fournit une mesure quantitative de diverses propriétés biochimiques et biophysiques de la cellule, mais sert aussi pour le tri sélectif de cellules (Greimers, 2002).

D'autres paramètres optiques mesurables incluent l'absorption et la dispersion de la lumière, ces derniers étant applicables à la mesure de la taille des cellules, leur forme, leur densité, leur granularité et leur coloration.

On peut ainsi analyser jusqu'à 30000 cellules par secondes et plus de 10 paramètres par cellule. Une autre caractéristique de certains appareils de cytométrie en flux est de pouvoir trier physiquement les cellules en fonction de leurs caractéristiques observées lors de l'analyse. Ce procédé d'analyse individuelle est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées (Greimers., 2002) (fig. 5).

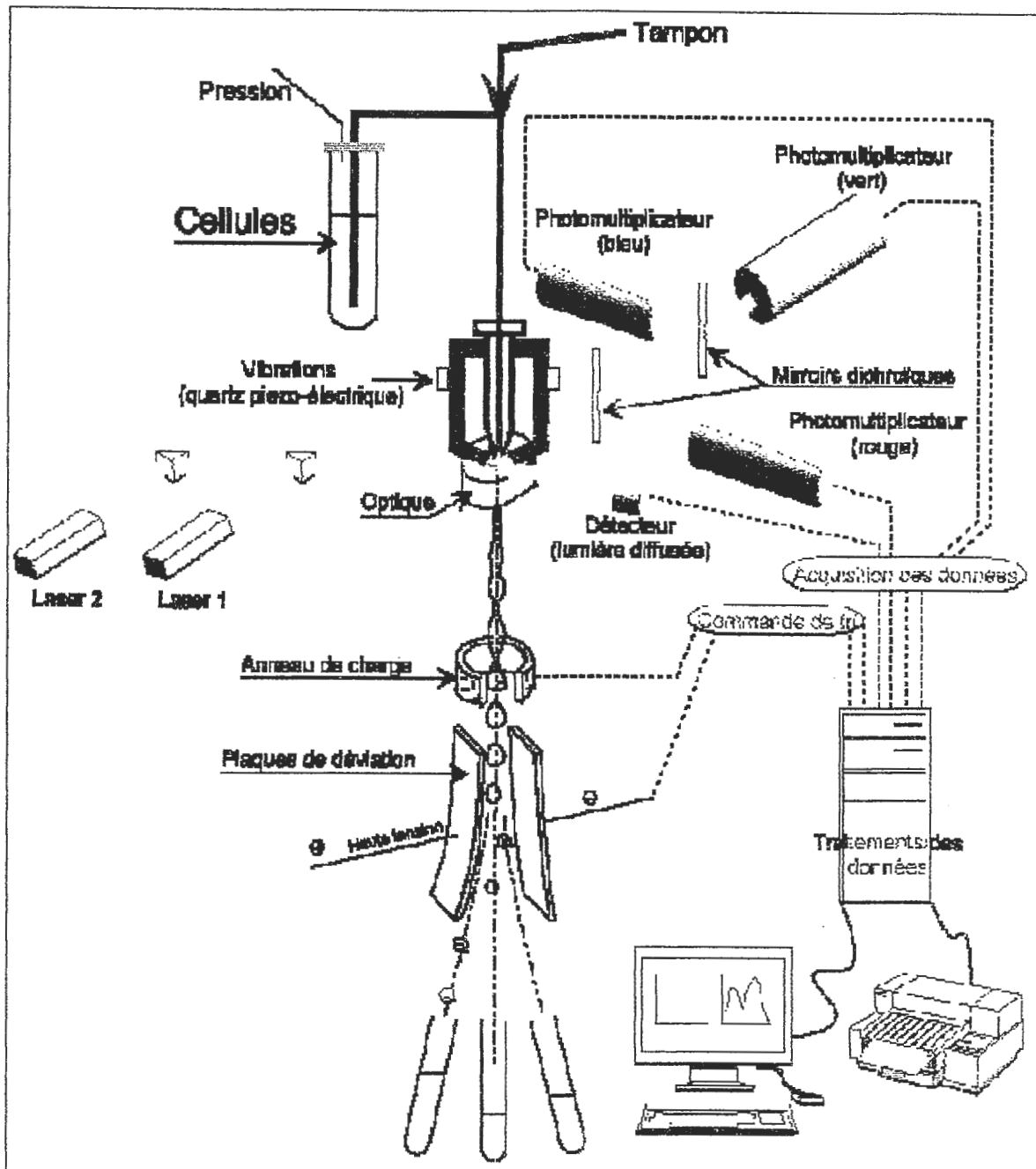


Fig. 5: Schéma de principe de l'analyse par cytométrie en flux (LE Pape, 2003).

- **L'alignement géométrique du laser et du flux**

L'impact d'un faisceau laser sur une cible (le flux) donne un spot lumineux dont l'intensité est variable dans toute sa section selon une loi approximativement normale : l'énergie lumineuse, pratiquement nulle à la circonférence du spot et augmente concentriquement jusqu'au centre de celui-ci. Le premier laser (#1) est orthogonal au flux qui traverse le faisceau par son diamètre : l'alignement est optimal et les différences des radiations lumineuses que subissent des cellules selon leur position relatives dans la

veine porteuse sont minimisées. Ce n'est plus le cas avec le second laser (#2) qui est décentré et responsable de mesures hétérogènes vides de sens. Le troisième faisceau laser (#3) est de section elliptique afin d'homogénéiser d'avantage les conditions d'illumination ; il est rencontré sur les cytomètres les plus récents (Greimers, 2002) (Fig.6).

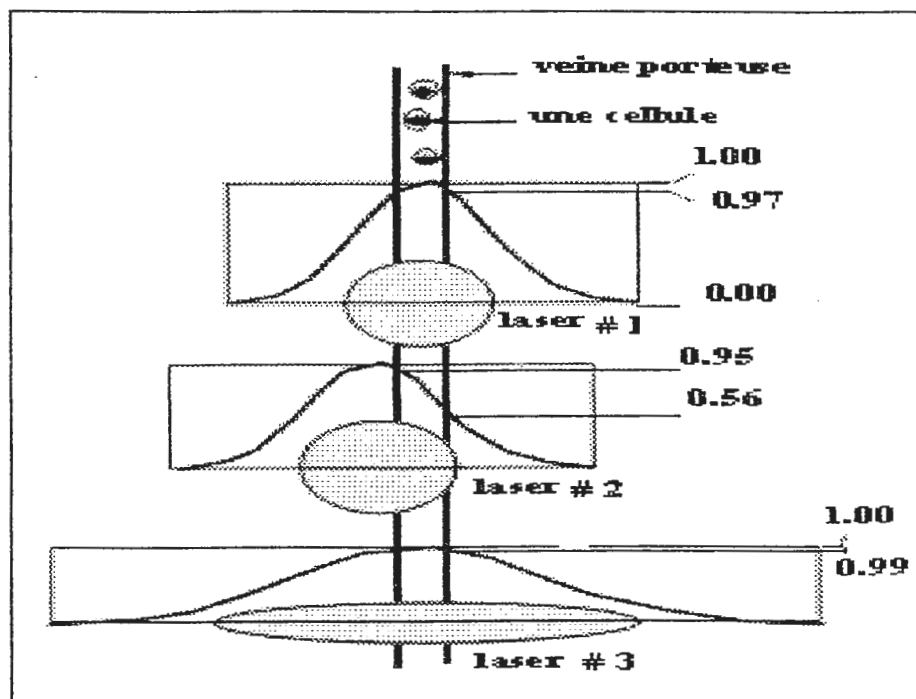


Fig. 6: L'alignement des lasers (Greimers, 2002).

- **Notion de temps mort du cytomètre**

Tant que la cellule est dans le laser et traitée par le cytomètre, celui-ci ne sait pas analyser une autre cellule qui arriverait trop vite derrière la première ; il existe une durée incompressible, appelée «temps mort» durant laquelle l'électronique est entièrement consacrée à l'étude de la première cellule. Toute autre cellule arrivant dans le cytomètre alors que l'analyse de la cellule en cours n'est pas terminée ne sera ni détectée, ni a fortiori analysée, elle est en coïncidence et rejetée de l'analyse. Conséquence : il existe des cellules (par exemple 2%) qui ne sont jamais vues par le cytomètre : un cytomètre est très mauvais moyen pour compter directement des cellules en nombre absolu. Cette notion est fondamentale dans le tri cellulaire (Greimers., 2002).

7. Les applications de la cytométrie en flux

Les applications peuvent être divisées en deux groupes :

- Analyse de constituants ou compartiments cellulaires, ADN, ARN, protéines, expression des antigènes (membranaires ou intracellulaires), enzymes, hormones.

- Analyse d'activités cellulaires fonctionnelles : réponse précoce à une stimulation cellulaire (modification de pH, du calcium « Ca⁺⁺ »), métabolisme oxydatif, potentiel membranaire.

7.1. Immunofluorescence

La nécessité de travailler sur des cellules en suspension mono disperse a fait de l'hématologie le premier domaine d'application de cette technique, mais elle est aussi utilisée pour l'étude des cellules adhérentes et des récepteurs intracellulaires. L'analyse en triple ou quadruple marquage est une pratique courante qui, avec des logiciels appropriés, permet de mettre en évidence, respectivement, 8 et 16 sous-populations allant des cellules ne présentant aucun des marqueurs à celle les possédant tous (Stewart et al., 1994).

En combinant l'utilisation de trois lasers, il a été décrit un septuple marquage (Roederer et al., 1996) ce qui porte à 128 le nombre de sous-populations identifiables. Dans la plupart des cas, la sensibilité des marquages utilisés est de l'ordre de 2000 molécules antigéniques par cellule ce qui est suffisant pour des marqueurs comme CD3, CD4, CD8. Pour des molécules comme les facteurs de croissance ou les cytokines il est nécessaire d'abaisser le seuil de détection à 100 molécules par cellule voir moins en utilisant des systèmes d'amplification (Zola et al., 1990). Parallèlement au repérage des sous-populations et à l'estimation de leur proportion, il est possible de quantifier les molécules de surface (Bikoue et al., 1996 ; Schwartz et al., 1996) en se référant à des standards de calibration interne.

7.2. Mesure du contenu en acides nucléiques

La détermination du contenu en acides nucléiques est une application courante de la cytométrie en flux. L'analyse mono paramétrique quantitative de l'ADN permet de connaître la ploïdie des cellules, leur répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire (Darzunkiewicz et al., 1994a) ainsi que la discrimination des cellules apoptotiques (Darzunkiewicz et al., 1997). L'analyse du contenu en ARN permet de distinguer les quiescentes en G₀, des cellules en G₁, et de suivre l'état de la différenciation cellulaire, elle sert aussi à l'identification des réticulocytes (Tanke et al., 1980). La corrélation des mesures ADN/ARN (Shapiro et al., 1981) met en évidence toutes les étapes du cycle cellulaire de G₀ à G₂/m, y compris pour chaque phase tous les stades intermédiaires : quiescence, transition (Darzunkiewicz et al., 1994b). Tous ces paramètres étant associés à la malignité des tumeurs. Ces mesures contribuent, en oncologie, au diagnostic, au pronostic, au suivi des traitements.

Pour évaluer plus précisément la prolifération cellulaire, on a recours à l'incorporation de bromodésoxyuridine par les cellules en phase de synthèse révélées par un anticorps fluorescent dirigé contre la bromodésoxyuridine (Dolbeare et al., 1983). L'association d'un marquage de récepteurs de surface caractérisera les sous-populations cellulaires en prolifération (Carayon et al., 1992).

L'analyse des acides nucléiques est devenue une technique de routine en biologie végétale, elle est aussi largement utilisée dans les recherches en biologie cellulaire et moléculaire.

7.3. Analyse de fonctions cellulaires

La cytométrie en flux offre la possibilité de combiner l'étude des paramètres physiologiques sur des cellules vivantes, avec celle des marqueurs de surface. Elle permet ainsi l'analyse fonctionnelle de sous-populations cellulaires. Par exemple, l'analyse de l'activation cellulaire peut se faire par la mesure des variations de pH (Boyer et al., 1994), de calcium intracellulaire (Rabinovitch et al., 1986), de production de cytokines (Frede et al., 1997), de potentiel membranaire (Shapiro et al., 1994). L'activation des polynucléaires est analysée grâce à la mesure du métabolisme oxydatif (Bass et al., 1983).

Des organelles comme les mitochondries (Maftah et al., 1989) ont fait l'objet de nombreux travaux, notamment pour la compréhension des mécanismes de l'apoptose (Zamzami et al., 1995). La mesure de la viabilité cellulaire permet d'exclure les cellules mortes de certaines mesures fonctionnelles, associée à d'autres marqueurs comme par exemple l'annexine V-FITC elle montre la succession d'étapes entre la cellule vivante et la cellule nécrosée en passant par l'apoptose.

La cytométrie en flux est tout à fait appropriée pour mettre en évidence des produits de transfection cellulaire soit par l'intermédiaire de marqueurs enzymatiques (D-galactosidase) (Nolen et al., 1988), ou de la « green fluorescent protein » « GFP » (Chalfie et al., 1994 ; Lybarger et al., 1996). Non seulement on évalue la population de cellules transfectées, le niveau et l'hétérogénéité de l'expression mais surtout on peut cloner les cellules sur la base de cette expression. Cette technique offre donc de multiples possibilités d'analyse mais elle nécessite une population de cellules parfaitement dissociées, en bon état et en nombre suffisant pour effectuer les contrôles et réglages indispensables à la fiabilité et à la reproductibilité des mesures. Il faut également s'assurer de la situation chimétrie de la coloration, de la concentration cellulaire optimale, du tampon requis, de l'effet du pH et utiliser des standards. Par contre elle ne permet pas de visualiser la morphologie de la cellule, à la différence des techniques microscopiques.

Chapitre II

II. Le stress oxydatif et apoptose

A. Le stress oxydatif

L'oxygène, qui est essentiel à la vie aérobie, est un élément qui peut être nocif. Sa toxicité provient de la formation de radicaux libres (Delattre et al., 2003), favorisant habituellement le bon fonctionnement de l'organisme. Si l'équilibre est rompu par un excès des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou une défaillance des systèmes antioxydants, la cellule est confrontée à un stress oxydant (autrement appelé stress oxydatif), (Demble and Amabile-Cuevas, 1991 ; Fontaine, 2001 ; Lean and Burns, 2001).

Pour définir le stress oxydant il faut savoir tout d'abord ce que sont les radicaux libres.

1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur sa couche externe et capable d'existence indépendante (Halliwell and Gutteridge, 1999). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité (demi-vie courte) et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques (Delattre et al., 2003), (Tab.1).

Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais la production peut devenir excessive conduisant à un état de stress oxydant (Pryor, 1986 ; Aourousseau, 1999).

2. Définition du stress oxydatif

Dans la cellule il existe un équilibre entre la production des ROS et leur élimination. Le stress oxydatif est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur de la production de ROS qui conduit donc à une oxydation accrue des composants cellulaires essentiels (Droge, 2002 ; Thannickal, 2000) (Fig. 7).

Les dommages cellulaires liés à un stress oxydatif se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Wiseman and Halliwell, 1996 ; Marnett, 2000 ; Cooke et al., 2003), des protéines (Stadtman and Oliver, 1991 ; Refsgaard et al., 2000 ; Davies, 2003), la perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire (Farber et al., 1990) ou encore la peroxydation des lipides (Servais, 2004).

3. Le mécanisme pro-oxydant

Une production continue d' $O_2^{\cdot -}$ se produit lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne. Si cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne que quelques pourcents de l'oxygène utilisé par la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique) ou lorsque intervient des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de ROS produits directement par les cellules phagocytaires activées soumises à un phénomène appelé explosion oxydative et qui consiste en l'activation du complexe de la NADPH oxydase capable d'utiliser de l'oxygène pour produire de grandes quantités d' $O_2^{\cdot-}$ dans la membrane cellulaire.

D'autres cellules comme les lymphocytes B possèdent sur leur membrane des systèmes NADPH oxydase similaires produisant des radicaux en quantité plus faible comme médiateurs intercellulaires. De plus, les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le TNF- α (Tumor necrosis factor), qui est capable de faire produire des ROS par la mitochondrie des cellules cibles (Soares, 2005).

Tab.1 : Les principaux ROS, (Florence, 1990 ; Ross and Moldeus, 1991 ; Yu, 1994).

Espèce	Symbole chimique	Demi-vie (seconde)	Caractéristiques
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	1×10^{-6}	Bon reducteur, pauvre oxydant
Radical hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}		Oxydant, plus liposoluble que $O_2^{\cdot-}$, peut initier la peroxydation lipidique
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Stable	Oxydant, réagit surtout avec des substrats organiques, très grande capacité de diffusion
Radical hydroxyl	$\cdot OH$	10^{-9}	Extrêmement réactif, très faible distance de diffusion
Radical peroxy	ROO^{\cdot}	1×10^{-2}	Pouvoir oxydant faible, mais grande capacité de diffusion
Radical alkoxy	RO^{\cdot}	1×10^{-6}	Intermédiaire réactif avec des lipides réactivité entre $\cdot OH$ et ROO^{\cdot}
Oxygène singulet	1O_2	1×10^{-6}	Agent oxydant puissant
Oxygène moléculaire	O_2	$>10^{-2}$	

Déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants = stress oxydatif

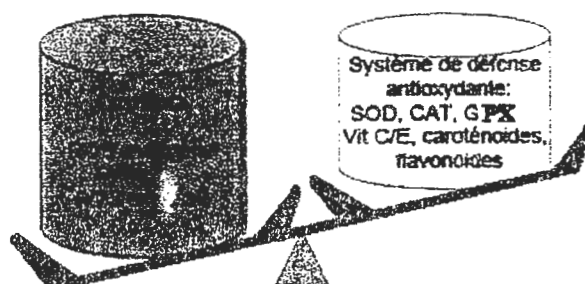


Fig. 7 : Le déséquilibre redox en faveur des oxydants

4. Les principaux espèces activées de l'oxygène

En dehors de toutes pathologies, une première origine des phénomènes radicalaires est la formation initiale de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le plus courant de ROS. Le premier mécanisme impliqué est la chaîne respiratoire (Cadenas et al., 1997).

Cet $O_2^{\cdot-}$ peut alors dismuter soit spontanément, soit de façon enzymatique par la Superoxyde desmutase (SOD) pour donner de l'eau oxygénée (H_2O_2), qui peut à son tour se transformer en radical hydroxyle ($\cdot OH$), le plus réactif de ROS. Ce dernier est formé par dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence des métaux de transition sous leur formes réduites ainsi, le peroxyde d'hydrogène s'associe à fer ferreux conduit à la réaction suivante de Fenton (Halliwell and Gutteridge, 1984) :



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical hydroxyle par la réaction suivante de Habber-Weiss :



Les radicaux $O_2^{\cdot-}$ peuvent réagir avec les radicaux $NO\cdot$ en conduisant à l'apparition de peroxydinitrite dont la toxicité est maintenant bien établie (Mccord and Day, 1987).

5. Les sources des ROS

5.1. Les sources exogènes

La production et la toxicité des ROS peuvent être exacerbées par de nombreux facteurs de l'environnement physiques ou chimiques. (Barouki and Mortel, 2001; Fentaine, 2001).

On peut citer comme facteurs exogènes induisent le stress oxydatif: L'exposition prolongée au soleil, et aux radiations, contacts avec les agents cancérigènes (amiante), tabagisme, prise de médicaments, pratique trop intense ou mal géré du sport, consommation excessive de l'alcool, stress intellectuel, stress thermique, ozonothérapie, pollution, agents infectieux et l'alimentation déséquilibrée (Dardik, 2000). L'exposition exogène des cellules, au peroxyde d'hydrogène, au peroxynitrique ou à des composés générateurs des ROS, entraîne la production des radicaux libres tels que l' $O_2^{\cdot-}$ dans le cas des herbicides, et aussi le métabolisme des agents anti-tumoraux (Haton, 2005).

5.2. Les sources endogènes

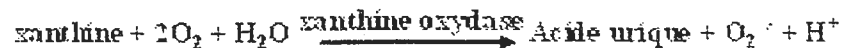
Dans l'organisme, il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. Les réactions chimiques de Fenton produit les ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (Droge, 2002; Thannickal, 2000). (Fig. 8).

5.2.1. L'autooxydation de petites molécules

Une importante source de ROS cellulaires est liée à l'autooxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones (Freeman, 1981), le produit direct de ces autooxydations est souvent l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, l'autooxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de parkinson (Thannickal, 2000).

5.2.2. La xanthine oxydase

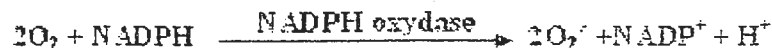
C'est une enzyme soluble qui génère les ROS en réduisant l'hypoxanthine en acide urique (Harrison, 2002). Ainsi cette voie de production des ROS participe notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\cdot-}$, selon la réaction ci-dessus (Mckelvey, 1988 ; Parks, 1988) :



5.2.3. La NADPH oxydase

C'est une enzyme liée à la membrane plasmique. Elle a été initialement décrite dans les cellules phagocytaires où elle joue un rôle dans la réponse immunitaire (Piotrowski, 2000), et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior, 1999).

Cette enzyme catalyse la formation de l' $O_2^{\cdot-}$ qui est à l'origine de la synthèse des molécules indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Comme l' H_2O_2 et l'hypochlorite (ClO) :



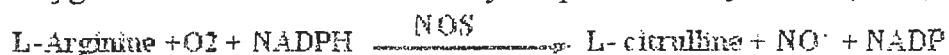
Cette voie de production des ROS est particulièrement stimulée au cours de processus infectieux et participe certainement stress oxydatif pouvant compliquer ces états (Haton, 2005). Il semble qu'il existe aussi une NADPH oxydase des cellules non phagocytaires dont le rôle est la régulation de la croissance cellulaire (Piotrowski, 2000).

5.2.4. Le réticulum endoplasmique lisse (REL)

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

5.2.5. La NO synthase

Plusieurs cellules peuvent produire le monoxyde d'azote (NO) à partir de l'arginine et de l'oxygène dans la réaction est catalysée par la NO synthase (NOS) :



En effet, les études réalisées à l'aide des enzymes purifiées ont montré que la NO synthase (NOS), est capable de générer des O_2^- dans des situations de déficit en son substrat, la L-Arginine, ou de ces cofacteurs d'activation (Servais, 2004 ; Haton, 2005 ; Xia, 1998).

5.2.6. Les peroxysomes

Est une source importante dans la production cellulaire de H_2O_2 car cet organe contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 . Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (Servais, 2004).

5.2.7. La mitochondrie

Sa membrane interne contient la chaîne de transport des électrons. Environ 3% d' O_2 subit une réduction monovalente conduisant à la formation de l' O_2^- lors du passage de la forme semi quinone à l'ubiquinone. Cette production radicalaire contribue aux attaques de l'ADN mitochondrial, puisque ce dernier se trouve soumis un flux continu de ROS et que, à l'inverse de l'ADN nucléaire, il ne dispose pas d'histones protectrices (Delattre et al., 2003).

5.2.8. Le noyau

Comme la membrane mitochondriale, la membrane entourant le noyau cellulaire, contient aussi une chaîne de transport d'électrons dont le rôle reste inconnu. Cette chaîne peut laisser échapper un certain nombre d' e^- susceptibles de réduire l' O_2 en O_2^- . Cela peut bien sûr avoir des conséquences néfastes en raison de la proximité de l'ADN nucléaire (Delattre et al., 2003).

5.2.9. Les ions métalliques

La réaction de Fenton est un exemple radicalaire catalysée par les métaux de transition et conduisant à la formation de radicaux $\cdot OH$ (Delattre et al., 2005).

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire, ils transforment le H_2O_2 en $\cdot OH$, encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration de fer ou de cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées de sorte cette réaction n'a pas lieu. En revanche, les destructions cellulaires (hémolyse, cytolysse...) entraîne une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydatif (Giratti, 1998 ; Burent, 1999).

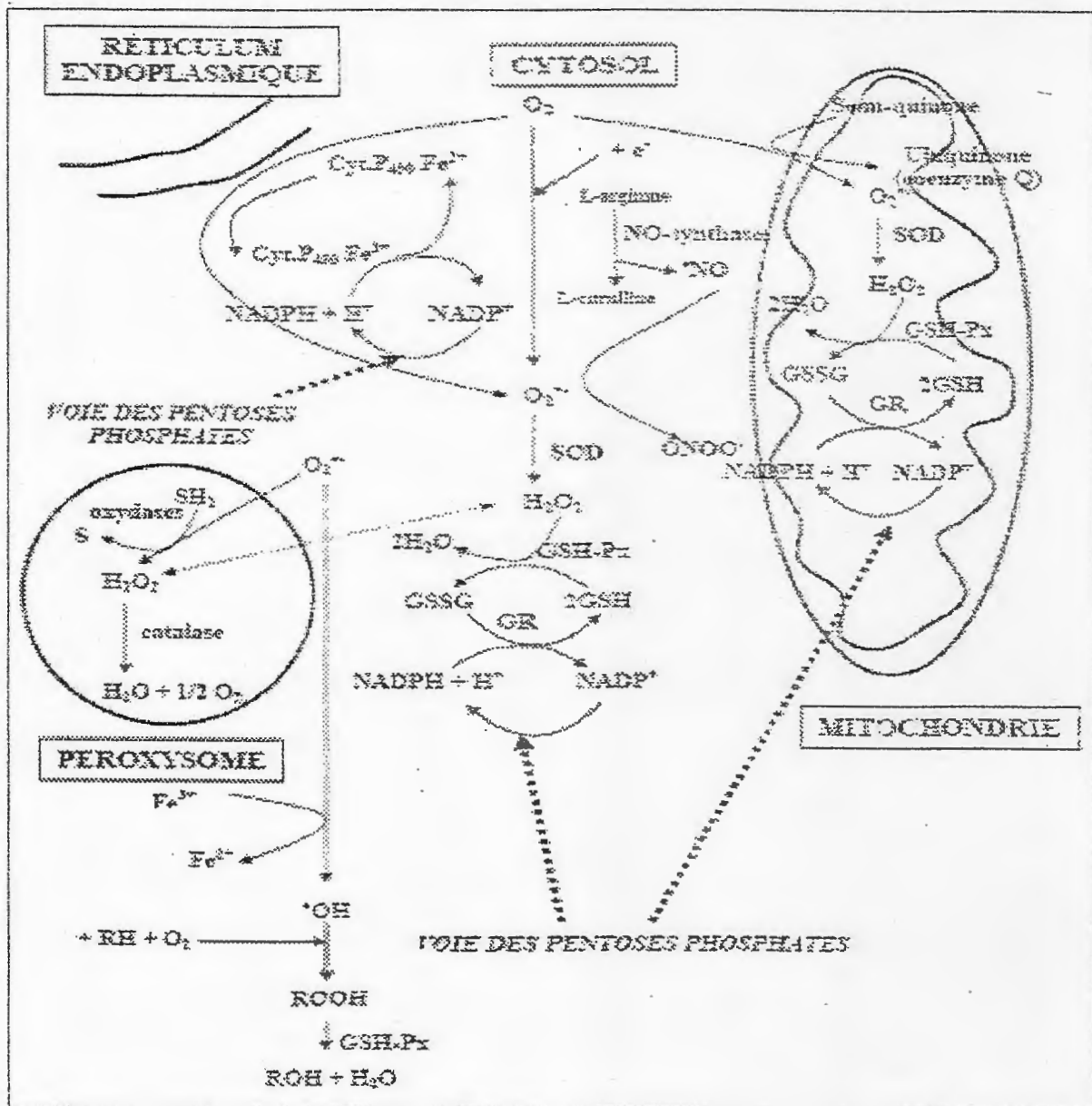


Fig. 8 : Les principales sources cellulaires des radicaux libres (Delattre et al., 2003)
 RH : acide gras polyinsaturé, ROOH : hydroperoxyde lipidique. SH₂ : substrat réducteur. S : substrat oxydé, SOD : superoxyde dismutase, GSHx : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase. GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.

6. Les dégâts de stress oxydatif

La réponse au stress oxydatif: Le système de défense cellulaire répond non seulement aux concentrations intracellulaires en ROS mais aussi aux concentrations extracellulaires (Baker et al., 1997). Une fois formés, les ROS peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques (enzymes, protéines, ADN, lipides, glucose), (Pincemail, 2004), (Fig.9).

➤ Les protéines

Sont endommagées par les ROS, et peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leur structures primaires et secondaire (Davies, 1999), mais les plus sensibles aux ROS sont celles qui ont des groupement sulfhydryles (-SH). L'oxydation des acides aminés

possédant des groupes -SH entraînent une modification structurale des enzymes cellulaires et des protéines de transport et donc par conséquent une altération de leur fonctions et deviennent inactive et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Le Pape, 2003 ; Sen, 2001).

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine, ces réactions d'oxydations sont fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} (Levine, 2002), et la formation de groupes nitrotyrosines (due à la formation du peroxyxynitrite) (Martinez-Cayuela, 1995).

➤ L'ADN

Les ADN nucléaires et mitochondriaux constituent une cible cellulaire importante. Les attaques radicalaires agissent directement sur l'ADN et provoquent l'oxydation au niveau des désoxyriboses ou des bases azotées ainsi des coupures mono- ou double brin de l'ADN (Borg and Reeber, 2004).

L' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en combinant avec le NO^{\cdot} Provoquent des effets délétères sur l'ADN. Ces lésions auront des conséquences sur le contrôle du cycle cellulaire et sur l'expression génique. Ainsi un stress oxydant moyen provoque la répression de gènes du cycle cellulaire. Pendant cet arrêt du cycle, la cellule vérifie son matériel génétique et éventuellement entre en apoptose. L'attaque radicalaire est en effet à l'origine de cassure ou d'anomalies chromosomiques, susceptibles de favoriser la cancérogenèse et le vieillissement tissulaire (Borg and Reeber, 2004).

Le stress oxydatif a également des répercussions sur l'ADN mitochondrial en particulier si la proportion de glutathion oxydée (GSSG) est importante. Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène peut provoquer la dégradation du RNA ribosomal mitochondrial (Imlay and Linn, 1988 ; Zastawny et al., 1998).

➤ Les lipides

Les membranes cellulaires constituent les premières cibles des radicaux libres circulants (Borg and Reeber, 2004), notamment les lipides présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires, à cause de leurs richesses en acides gras polyinsaturés qui sont très sensibles à l'oxydation grâce à leurs degrés d'insaturation (Hulberth, 2005). La peroxydation lipidique induit une modification de fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits essentiellement le MDA (malondialdéhyde), le 4-HDA (4- (hydroxyalkenal) et le 4-HDN (4-hydroxynonenal) qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (fig.10) (Marnett, 1999., Borg and Reeber, 2003).

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de traces métalliques en libérant des cetoaldehydes, H_2O_2 et $\cdot\text{OH}$. Son oxydation entraîne la coupure des protéines et leur glycation par attachement du cetoaldehyde (Wolff et al., 1989).

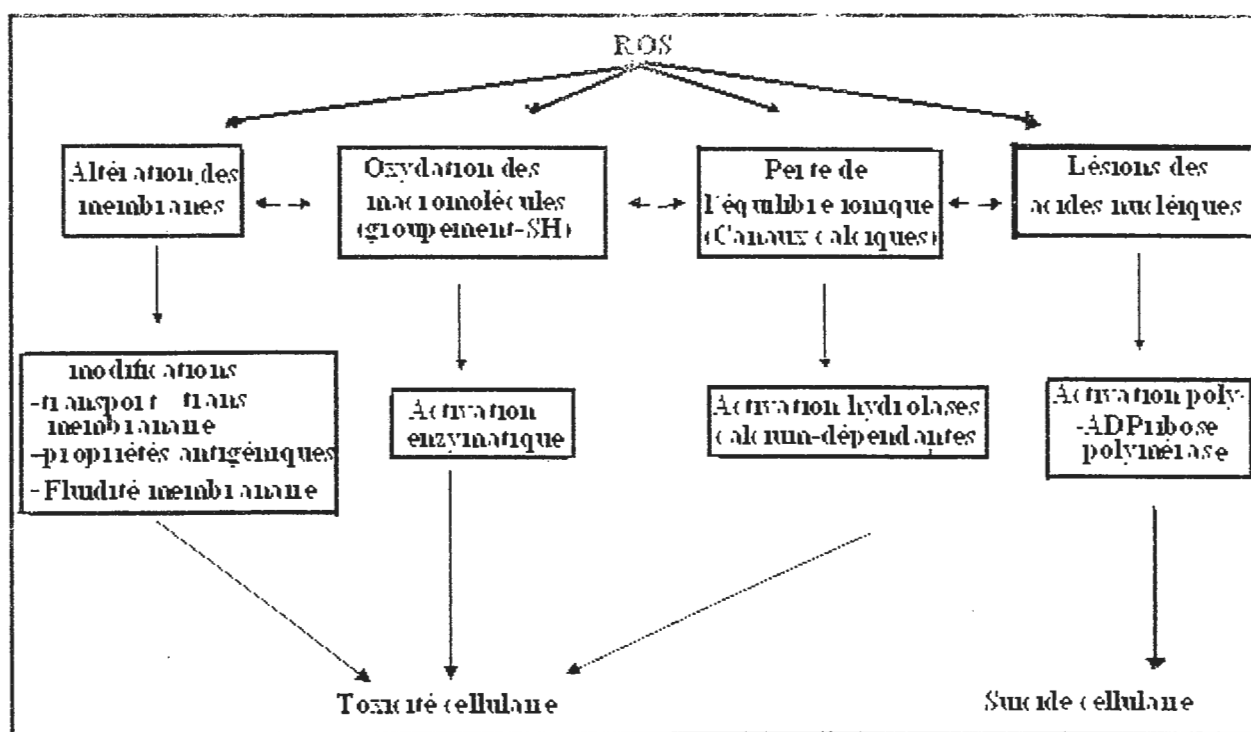


Fig. 9: Les principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires conséquence d'un stress oxydant, (Roberfroid and Calderon., 1995).

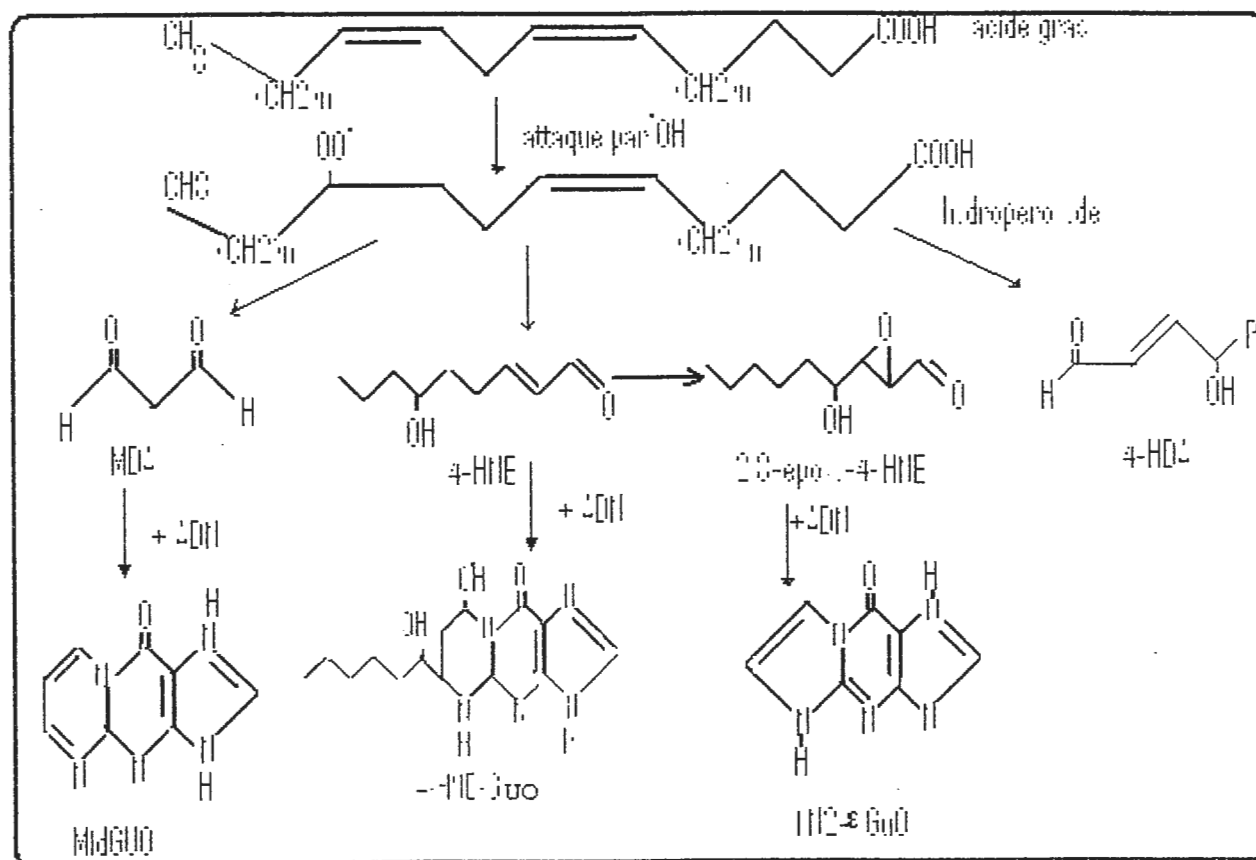


Fig.10 : la voie de la peroxydation lipidique et son effet sur l'ADN (Servais, 2004 ; Borg and Reeber, 2004). M1dGuo: pyrimido-[1,2a] purin- 10(3H)-un ; HNE-Guo: 6-(1-hydroxyhexanyl)-8-hydroxy-1, N²-propano-2'-deoxyguanosine. 1,N²-ε Guo: 1, N-ethenodeoxyguanosine.

7. Les mécanismes antioxydants

Afin que les ROS n'exercent pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense : les antioxydants (Pincemail, 2004). Qui peuvent être définis comme toute substances qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1994).

Il existe deux sources de défense antioxydantes : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamine C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoides, glutathion ou acide lipoïque tandis que l'autre est endogène et compose d'enzymes (SOD, Glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine).

A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydantes (Pincemail, 2004). (fig.11)

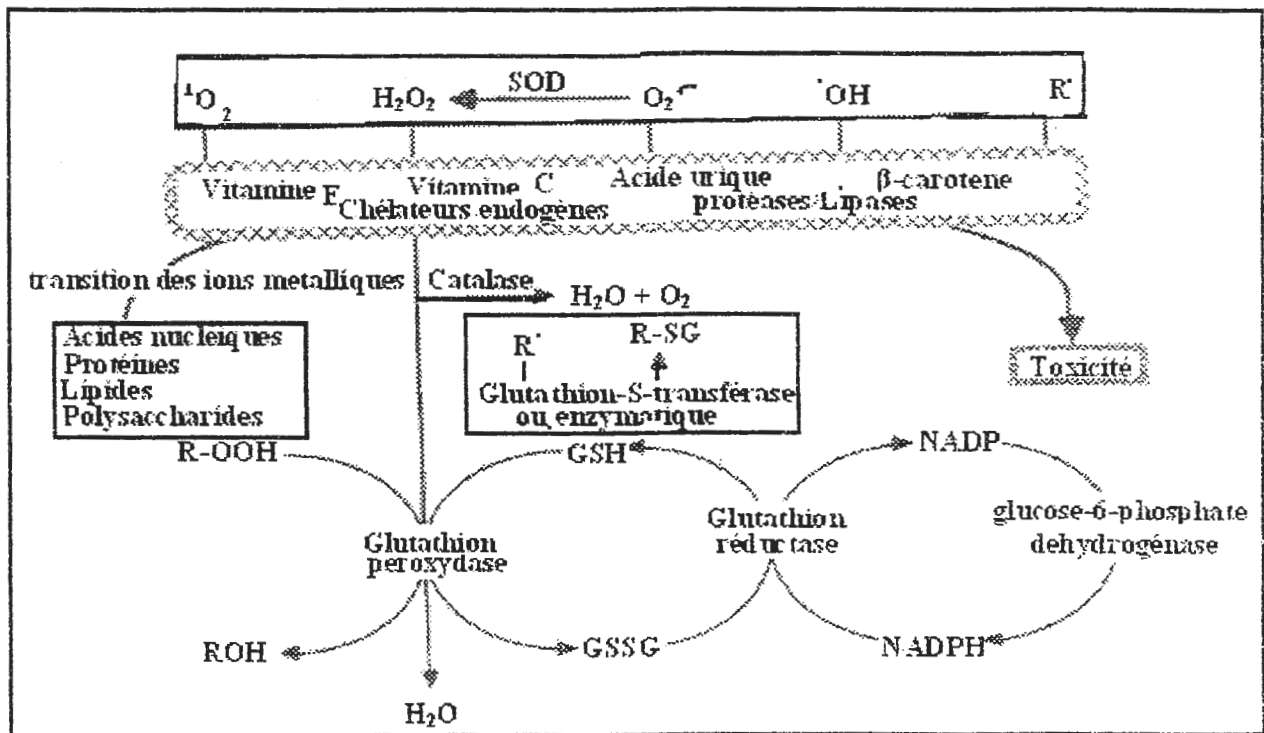


Fig.11 : Systèmes biologiques de défenses antioxydantes (Kehrer, 1993).

7.1. Les systèmes de défenses enzymatiques

Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives, (Tab.2).

7.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. L' H_2O_2 étant beaucoup moins réactif (Marmen et al., 1997).

7.1.1. Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. L' H_2O_2 étant beaucoup moins réactif (Moumen et al., 1997).

Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko et al., 2002) et forment un puit hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l' $O_2^{\cdot-}$.

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permet de distinguer les différentes SODs : une forme à cuivre zinc (CuZn-SOD) (Banci et al., 1998) sont aussi classées selon leur rôle dans l'organisme : (CuZn-SOD) protégeant le cytosol, des (CuZn-SOD)s situées à la face externe de la membrane des cellules endothéliales et l'espace interstitiel des tissus et les fluides extracellulaires et d'autres dans le plasma sanguin (Kaynar, 2005), une forme à manganèse (Mn-SOD) et au fer (Fe-SOD) sont homologues, son rôle biologique est la protection de la mitochondrie (Fridovich, 1998), et la SOD au nickel (Ni-SOD), (Barondeau et al., 2004).

7.1.2. Les catalases

Les catalases sont généralement des enzymes hémiques tétramériques, chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH, leur rôle majeur est de diminuer la formation des radicaux $\cdot OH$ générés par la réaction de Fenton à partir de H_2O_2 (Pelmont, 1995 ; Sies, 1985 ; Matès et al., 1999 ; Fridovich, 1999).

Elles sont présentes essentiellement dans les peroxysomes qui sont également le lieu de la production de substrat de l'enzyme, dans le foie, les reins et les érythrocytes, mais seulement en petite quantité dans le cerveau (Halliwell and Gutteridge., 1985 ; Delattre et al., 2003).

7.1.3. Les glutathions peroxydases (GPx)

Les (GPx) sont des enzymes qui catalysent la réduction de H_2O_2 et une variété d'hydroperoxydes organiques (ROOH), en utilisant le glutathion (GSH) comme agent réducteur. Il existe quatre types (GPx) séléno-dépendantes (Chance, 1979 ; Zachara, 1992 ; Yu, 1994 ; Chu et al., 1993) : (GPx) cytoplasmique, (GPx) plasmatique, (GPx) gastro-intestinale et la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase liée à la membrane cellulaire. L'activité anti-oxydante de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier, 2003).

Il existe de plus des (GPx) indépendantes du sélénium, comme la glutathion transférase, (Matès, 1999).

D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante (Gueye, 2007).

Tab. 2 : les enzymes de détoxification et des réactions catalysées. (PELMONT, 1993 ; GRIMAUD et al., 2001).

Enzymes	Réactions catalysées
superoxyde dismutase (SOD)	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
catalase	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
peroxydase	$H_2O_2 + 2G-SH \rightarrow G-S-S-G + 2H_2O$
glutathion-peroxydase (GPx)	$O_2 + G-S-S-G + NADH, H^+ \rightarrow 2G-SH +$
glutathion-réductase	$NADP^+ + NADH, H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$

7.2. Les systèmes de défense non enzymatiques

Ce groupe de système renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. de tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les ROS, mais aussi contre les peroxydes ou le NO[•] (Favier, 2003).

La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxydes RO₂[•] et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil and Stocker, 1993).

Les hormones sexuelles femelles, grâce à la présence d'un hydroxyle phénolique au niveau de leur structure chimique, peuvent inhiber la peroxydation lipidique des LDL in vitro, à des concentrations micromolaires (Keaney et al., 1994).

Des composés comme les thiorédoxines molécules protéiques ont une activité intrinsèque d'oxydoréduction comme toute les protéines à groupement thiol, les métallothionéines sont activités est la détoxification des métaux lourds (Mistui et al., 1992 ; Liu et al., 1995) en limitant la réaction de Fenton, leur rôle est démontré dans différents cas de stress oxydant (Koropatnick et al., 1989 ; Bauman et al., 1991 ; Sato and Brenner, 1993 ; Good and Vasak, 1986 ; Cai et al., 1999).

D'autres composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes, apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Krinsky, 1989). La vitamine piègeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénérée par un autre système. la vitamine E empêche la propagation des chaînes radicalaire dans les lipides, la vitamine C inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant de la vit E et aussi protège efficacement les protéines, la vit C elle-même est régénérée par les ascorbates réductases (Dean and Cheeseman, 1987 ; Packer, 1991 ; Januel, 2003) .

Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols, les flavonoides (flavones et les flavonols) présents dans les plantes et les phytates, apportés également par l'alimentation,

jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (Bors et al., 1990 ; Halliwell and Gutteridge, 1989).

Des protéines comme l'haptoglobine, la transferrine, l'hémopexine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} .

Les protéines du choc thermique ("heat shock protein" 90, HSP 90, HSP 70) agissent en protégeant les biomolécules contre les agressions, notamment les oxydations (Conconi et al., 1996 ; Conconi and Friguet, 1997 ; Conconi et al., 1998 ; Wirth et al., 2003).

Les oligoéléments (Cu, Zn, Se, Mn, Cr) ont aussi des propriétés antioxydantes, notamment de cofacteurs aux enzymes antioxydantes (Januel, 2003).

8. Les marqueurs biologiques du stress oxydant

Les molécules biologiques cibles, sous l'effet direct des radicaux libres, peuvent être soit oxydées sur des sites spécifiques, soit être clivées, soit au contraire être polymérisées (Favier, 1997). Ces différentes altérations biochimiques peuvent être utilisées pour évaluer le stress oxydant (Slater, 1984). Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies. Ainsi, de nombreuses techniques ont été développées pour l'évaluer.

L'identification d'un stress oxydant se fait par le choix des marqueurs adaptés au phénomène à étudier et à sa localisation (marqueurs d'oxydation lipidique pour une agression extracellulaire, ou marqueur d'oxydation de l'ADN pour une irradiation attaquant le noyau cellulaire). De plus, une combinaison d'au moins 2 marqueurs différents est souvent indiquée pour pallier l'absence d'un marqueur idéal (Gutteridge, 1992 ; Favier, 1997).

Le stress oxydant peut être évalué par trois grandes voies d'approches (Bonfont-Rousselot et al., 2003 ; Favier, 2003) :

- La mesure de la production des ROS
- La mesure des capacités de défense (statut anti-oxydant)
- La mesure des désordres biochimiques spécifiques créés par l'attaque des radicaux libres sur les principales cibles moléculaires (protéines, lipides et acides nucléiques).

8.1. Mesure des radicaux libres

La détection et la quantification des radicaux libres est actuellement possible grâce à l'utilisation de la résonance para-électronique (RPE ou ESR) (Wertz and Bolton, 1972).

Aussi, un artifice pour augmenter la durée de vie des radicaux libres est souvent employé : la technique du "spin trapping", elle consiste à réaliser une réaction d'addition entre le radical et un autre composé (en général un nitroxyde) pour obtenir un produit radicalaire d'une durée de vie plus longue et détectable par RPE (congélation dans l'azote liquide), (Favier, 1997 ; Delattre et al., 2003).

Une autre difficulté dans la mesure de ces n'est pas sans danger. En fin, il est possible de mesurer la lumière produite par décomposition des radicaux libres en chimiluminescence, mais celle-ci est excessivement faible (Torreilles and Guerin, 1995).

En pratique, la chimiluminescence mesure plutôt la lumière produite par réaction des radicaux libres avec des sondes lucigéniques comme le luminol ou la lucigénine,

mais beaucoup d'interférences dues à la présence d'acide urique ou de peroxydes sont possibles (Gueye, 2007).

8.2. Mesure des systèmes anti-oxydants

8.2.1. Systèmes enzymatiques

Il est possible, pour évaluer un stress oxydant, de mesurer l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases, les glutathion peroxydases, la glutathion réductase et la catalase. Ces déterminations sont possibles aussi bien dans le sérum qu'au niveau des éléments figurés du sang (Gueye, 2007).

Les superoxydes dismutases (SOD)

Le substrat de la SOD (le radical superoxyde) est instable et a une durée de vie très courte. Ainsi, la plupart des méthodes de dosage utilisées pour déterminer l'activité superoxyde dismutase sont indirectes.

Les radicaux produits par le système xanthine- xanthine oxydase réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée. Par ailleurs, la mesure de la superoxyde dismutase exprimée en concentration de protéine peut être réalisée par dosage radioimmunologique (Asayama and Burr, 1985).

En cas de stress oxydant modéré, l'organisme réagit en surexprimant la SOD notamment en cas d'exercice physique (Mena et al., 1991 ; Levine and Kidd, 1996). Si le stress oxydant perdure et produit de façon massive des ROS, la SOD sera détruite. Paradoxalement, une activité trop élevée de cette enzyme peut s'avérer dangereuse, car elle peut être à l'origine d'une surproduction de peroxyde d'hydrogène (effet paradoxal des anti-oxydants) (Pincemail et al., 2001).

- **Les glutathion peroxydase**

L'activité (GPx) peut être dosée dans différents milieux extracellulaires et intracellulaires. Le prélèvement et le traitement des échantillons doivent prendre en compte la fragilité relative de cette enzyme (Richard, 1997).

En pratique courante, l'activité GPx érythrocytaire est la plus fréquemment mesurée. La détermination de l'activité de cette enzyme est basée sur la réduction d'un hydroperoxyde (ROOH) en présence de glutathion réduit (GSH). Les méthodes directes mesurent le glutathion non consommé par polarographie (Flohé and Gunzler, 1984), mais les techniques les plus fréquemment utilisées sont des techniques indirectes utilisant la glutathion réductase comme enzyme auxiliaire, avec suivi de la consommation de NADPH, H^+ à 340 nm. (Paglia and Valentine, 1967). Par ailleurs, la mesure de la concentration de la protéine GPx est possible par dosage radio-immunologique (Takahashi et al., 1987). Tout comme les SOD, les GPx se comportent de deux façons différentes en fonction du niveau de stress oxydant : surexpression de l'enzyme dans un premier temps puis destruction si le stress perdure (Pincemail et al., 2001). Une diminution de l'activité de la GPx peut également être liée à une carence en sélénium (Favier, 2003).

- Autres enzymes

Les activités d'autres enzymes telles que la glutathion-réductase, la catalase, l'hème oxygénase et la thioréductase peuvent également être déterminées, mais l'interprétation des résultats est souvent difficile du fait des nombreux facteurs pouvant faire varier leur concentration, tels que la vitamine C ou la bilirubine (Ryter et al., 2000 ; Pincemail, 2001).

8.2.2. Systèmes non enzymatiques

Le groupe des anti-oxydants non-enzymatiques comprend de nombreux composés, dont certains sont hydrophiles (vitamine C, glutathion) et d'autres lipophiles (tocophérol, β -carotène, ubiquinol). Les concentrations de tous ces composés peuvent être déterminées aussi bien au niveau du plasma que des éléments figurés du sang et servir à l'évaluation du statut anti-oxydant de l'organisme.

Le plasma renferme de nombreuses substances anti-oxydantes dont certaines sont connues (GSH, protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine, ...).

L'évaluation des constituants ayant un rôle anti-oxydant, tels que les vitamines A, E et C, le glutathion, le sélénium, le cuivre et le zinc, renseigne sur la propension d'un individu à développer un stress oxydant.

Quel que soit le paramètre, sa détermination nécessite de réelles précautions de prélèvement et de traitement de l'échantillon biologique, rendant difficile sa réalisation en routine (Beauvieux and Peuchant, 2002).

8.3. Mesure des désordres cellulaires liés au stress oxydatif

8.3.1. Marqueurs de la peroxydation lipidique

L'atteinte des phospholipides membranaires va entraîner une modification de la fluidité membranaire, altérer les systèmes de transfert d'ions ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecter les voies de transduction des signaux (Stubbs, 1983 ; Levine et al., 1990 ; Clamp et al., 1997 ; Hochgraf et al., 1997 ; Favier, 2003).

le stress oxydatif peut être évalué par les produits issus de la peroxydation lipidique (tels que le MDA, 4-HDA, 4-HDN) semblent être les meilleurs marqueurs du stress oxydant, même si les ROS provoquent également des modifications oxydatives de l'ADN et des protéines (Lefèvre et al., 1998).

8.3.2. Marqueurs de l'ADN

De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-guanosine, le thymidine glycol, la 8-hydroxyguanine, la 8-hydroxyadénine, la 5-hydroxy-méthyl-uracil, le cytosine-glycol (Demple, 1991).

Parmi les composés d'oxydation de l'ADN, deux d'entre eux se sont révélés être des marqueurs intéressants. Il s'agit de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) et du thymidine glycol (Fairbairn et al., 1995).

La mesure des altérations de l'ADN par l'HPLC couplée à la spectrophotométrie de masse, permet d'identifier et de quantifier la 8-oxoguanine, biomarqueur "classique" des

dommages à l'ADN (Collins, 2006). Actuellement, il est possible de déterminer la 8-hydroxy-2'déoxyguanosine par une technique immunologique (Elisa) très simple d'utilisation soit dans le plasma (marqueur de l'oxydation) ou dans l'urine (marqueur de la présence de réparation de l'ADN), (Pincemail et al., 1999).

8.3.3. Les marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés

On peut observer une oxydation des chaînes latérales des acides aminés, notamment de la cystéine et de la méthionine, avec formation de ponts disulfures. La nitration des protéines par le peroxy-nitrite se traduit par l'inactivation de nombreuses enzymes telles que la Mn-superoxyde dismutase (Davies, 1987 ; Stadtman, 1993 ; Grune et al., 1998).

La détection des groupements carbonyles au niveau des protéines oxydées est de loin la technique la plus utilisée (Pantke et al., 1999). En présence de 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), ces dérivés carbonyles peuvent être dosés dans les spécimens biologiques par spectrophotométrie, CLHP, ou grâce à l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux (Levine et al., 1994).

D'autres marqueurs d'oxydation des protéines, en particulier le sulfoxyde de méthionine, la nitrotyrosine et l'ortho-tyrosine, ont été décrits comme présentant une meilleure spécificité (Davies et al., 1999).

9. Le rôle physiologique des ROS

Le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'initiation ou le fonctionnement propre de diverses voies de signalisation en réponse à la stimulation de certains récepteurs par des cytokines, des facteurs de croissance ou par des hormones est décrit dans la littérature (Usatyuk et al., 2003 ; Carvalho et al., 2004 ; Go et al., 2004 ; Sigaud et al., 2005).

Les ROS participent au contrôle de l'équilibre cellulaire, ils sont capables de moduler la prolifération, la différenciation, comme ils agissent comme médiateurs dans les voies de signalisation de l'apoptose (Kamata and Hirata, 1999 ; Murrell et al., 1990 ; Sigaud et al., 2005 ; Fleury et al., 2002).

B. Apoptose

Le développement harmonieux et la survie de tout organisme multicellulaire résultent d'un contrôle précis du nombre de cellules qui le composent grâce à un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire.

La reconnaissance que la mort est un phénomène biologique important ne venue que beaucoup plus tard avec l'essor de microscope et de la théorie cellulaire, plusieurs études de biologie du développement ont contribué à l'idée d'une mort cellulaire physiologique et active (Brush et al, 2000 ; Jones, 2001).

1. Définition

En 1972, l'équipes de Kerr a proposé le terme « apoptose » qui, en grec, décrit la chute des feuilles en automne pour décrire un processus de mort cellulaire hautement régulé (Thomas et al., 2004 ; Lucil, 2005). L'apoptose est un processus naturel de mort cellulaire programmée qui se produit en réponse à un stimulus spécifique et selon un programme intrinsèque bien défini (Johnstone et al., 2002), et par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction (Reed, 2003). Ce type de mort cellulaire est parfaitement intégrée dans les processus physiologique normaux de la cellule (Groux H et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Griffith et al., 1995), elle est défini par des modifications morphologiques caractéristiques, condensation de la chromatine, dégradation de l'ADN, fragmentation de la cellule en « corps apoptotique », délimité par une membrane sans qu'il y ait fuite de contenu cellulaire, les phosphatidylsérines qui sont normalement dans le feuillet interne de la membrane des cellules normales, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules (Messmer and Pfeilschifter, 2000), suivies d'une phagocytose et d'une dégradation rapide des corps apoptotique par les cellules voisines (Thomas et al., 2004).

2. Apoptose et nécrose

La définition de l'apoptose vise à exclure la mort cellulaire dénommée : « nécrose » : est une mort « désordonnée » et accidentelle. Elle se caractérise par une augmentation du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et la dispersion du contenu cellulaire provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Par opposition, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée rapide (quelques heures) et discrète mettant en œuvre une véritable machinerie interne de destruction de la cellule, procédant par différentes phases chronologiques (Kerr et al., 1972 ; Duvall and wyllie, 1986).

3. Rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose est observée chez tous les métazoaires aussi bien chez les végétaux que chez les animaux (Thomas et al., 2004). Elle a plusieurs rôles essentiels pour l'organisme. Elle assure le remodelage et le maintien de l'homéostasie tissulaire, c'est-à-dire la conservation du nombre et de la qualité des cellules qui les constituent (Evan and Littlewood, 1998), intervient dans la suppression des cellules en surplus, endommagées ou âgées, dans les tissus sains tout comme lors de la maturation des organes (Pelletier and

Valette, 2001). Elle sculpte la forme interne et externe de l'embryon, puis la forme des bras, des jambes et elle élimine les tissus qui séparent les doigts permettant leur individualisation (Meirer et al., 2000). Elle participe également à la construction de système immunitaire et du cerveau (Oppenheim, 1991).

4. Aspects pathologiques de l'apoptose

Toute anomalie de l'apoptose peut être responsable du déclenchement et de la progression de nombreuses pathologie (Groux H et al., 1991 ; Mapara et al., 1993 ; Fisher, 1994 ; Griffith et al., 1995), certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, syndromes lympho-prolifératifs...) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ces phénomènes (SIDA, maladie neurodégénératives. maladies auto-immunes,...). (Thomas et al., 2004).

5. Les phases de l'apoptose

L'apoptose peut être divisé en trois phases séquentielles dans le temps : la phase d'initiation, la phase d'exécution, toutes deux réversibles et modulables par des facteurs antiapoptotiques, et la phase de dégradation protéolytique et nucléaire qui est irréversible et se traduit par des modification morphologiques et biochimiques (Duneau, 2005) (Fig. 12).

5.1. La phase d'induction

De nombreux signaux très différent physiologique comme pathologiques ; intra comme extracellulaire ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ainsi l'apoptose peut être induite par la carence en facteurs de croissance [Nerve Growth Factor (NGF), Interleukine-2(II-2)], par certains récepteurs membranaires [Fibroblastes associated (Fas), Tumeur Necrosis Factor Receptor (TNF-R)] lorsqu'ils sont stimulés et liés à leurs ligands, par des dommages intracellulaires causés par radiations ionisantes, des agents cytotoxiques, chocs osmotiques (Duneau, 2005).

5.2. La phase d'exécution

Les différents signaux de mort sont alors intégrés par la cellule qui, en fonction de son phénotype et son état physiologique, va orienter sa réponse vers la mort ou la prolifération. Cette intégration fait appel à un certain nombre de médiateurs intracellulaire anti-ou pro-apoptotique tels que les caspases, le stress oxydant, les protéines de la famille de B cell lymphoma protein-2 (Bcl-2), les ceramides (Duneau, 2005).

5.3. La phase de dégradation

En dépit de la diversité de ces signaux de mort, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaire (Duneau, 2005).

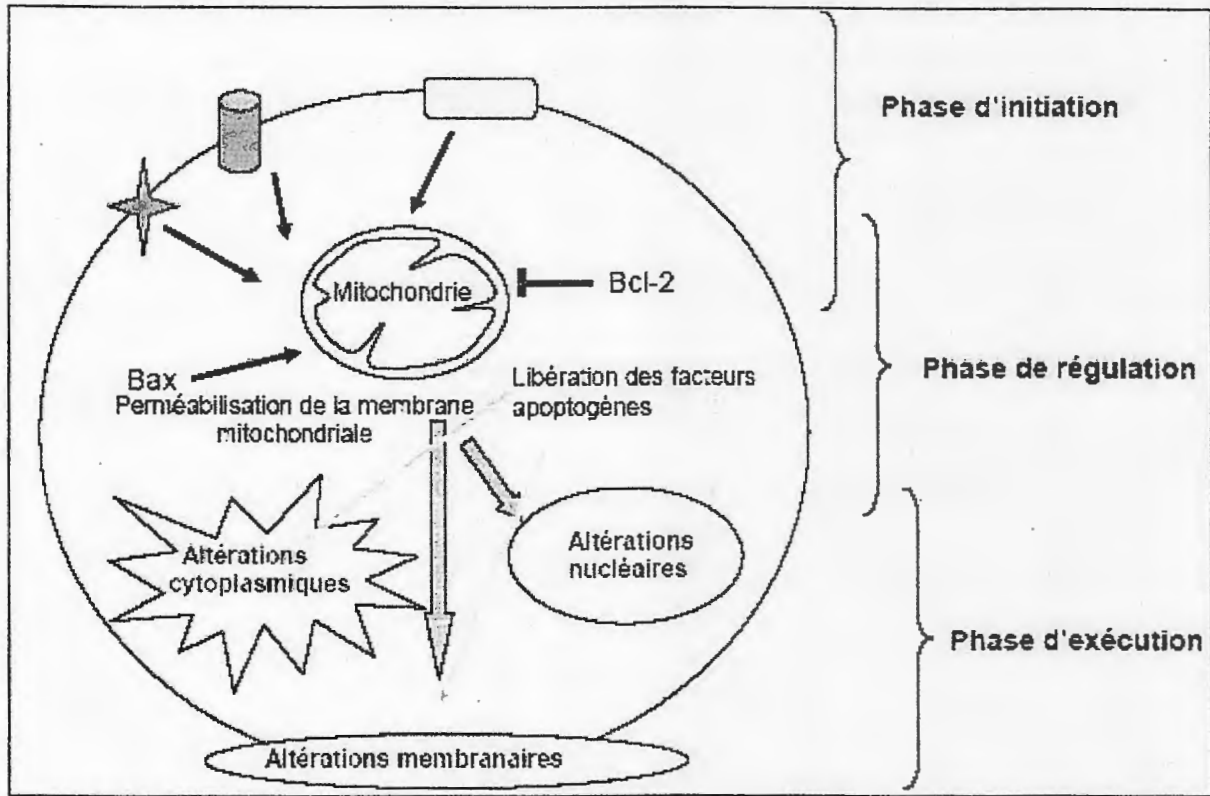


Fig.12 : Les phases de l'apoptose mitochondriales (Joubert, 2006).

6. Effecteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose

6.1. Les caspases

Les caspases «cysteine aspartate-specific proteases» sont des protéines intracellulaires intervenant dans les processus de mort cellulaire après stimulus (rayons UV ou Y, molécules chimiques...). Le terme de caspase a été proposé par Alnemri et al., (1996) : le « C » représente la cystéine du site active et « aspase » définit la spécificité de clivage après un acide aspartique.

a. Structure et nomenclature

Les caspases sont synthétisées sous la forme de pro-caspase (zymogènes). Toutes les pro-caspases contiennent un pro-domaine N-terminal de taille et de séquence variables, une grande sous-unité (20kDa) portant le site catalytique et une petite sous-unité (10kDa) sur la partie C-terminale (Thomberry, 1998), avec un motif conservé QACXG (Wolf of green, 1999). Ces deux sous unités s'associent pour former un hétérodimère et deux hétérodimères s'associent pour former un tétramère, qui est la forme active des caspases (Walker et al., 1994).

b. Classification des caspases

On connaît aujourd'hui 14 caspases différentes dont 11 chez l'homme (Ferri KF, 2000). Les caspases ont été classées selon la taille de leur pro-domaine (Leblanc, 2003).

Les caspases possédant un pro-domaine long (> 100 acides aminés) sont les caspases dites initiatrices ou régulatrices. Ces pro-domaines contiennent des motifs peuvent être des DED « death effector domain » retrouvés dans les caspases-8 et -10 ou des caspase recrutement domain (CARD) dans les caspases-1,-2,-4,-5,-9,-11,-12,-13 et-14 (Joubert, 2006).

Les caspases qui possèdent un pro-domaine court (< 30 acides aminés) se situent en aval. Ce sont les caspases exécutrices ou effectrices. Les caspases-3, -7 et -6 sont les caspases directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit en cascade, phénomène irréversible. L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de nombreuses protéines cellulaires, aboutissant aux étapes terminales et ultimes de l'apoptose (Joubert, 2006).

6.2. Les protéines de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont des protéines intracellulaires essentielles à la régulation de la survie et de l'apoptose (Ashe and Berry, 2003). Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotique (comme Bcl-2 et Bcl-xl « Long variant d'épissage de la protéine Bcl-x ») (Adams and Cory, 1998).

a. Classification

L'alignement des séquences protéiques des membres de la famille Bcl-2 a permis d'identifier quatre régions, hautement conservées, appelées BH (Bcl-2 homology) : BH1 à BH4 (Adams et and Cory, 1998 ; Tsujimoto and Shimizu, 2000). Certaines molécules pro-apoptotiques contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3 (Bak), tandis que d'autres ne contiennent que le domaine BH3 (Bid « BH3 interacting domain death agoniste », Bim « Bcl-2 interacting of cell death », Bad « Bcl-2 antagoniste of cell death protein »). Le domaine BH4 est quant à lui spécifique des protéines anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-L, Al, Diva). (Adams and cory, 1998).

6.3. Les protéines de choc thermique (Hsp)

Les protéines de choc thermique ou Hsps (heat shock protein) sont codées par des gènes dont l'expression est induite lors de stress thermique, par des inhibiteurs du métabolisme énergétique, par des métaux lourds, par un stress oxydatif, ou par l'inflammation. Lors de tels stimuli, ces protéines protègent les cellules en agissant sur les protéines altérées afin d'éviter leur agrégation (Skowya et al., 1990). En conditions normales, les protéines Hsps sont chargées du bon repliement des protéines, de leur translocation, de l'activation de protéines régulatrices comme les facteurs de transcription, de la dégradation des protéines et de la présentation de l'antigène (Helmbrecht et al., 2000 ; Jolly and Morimoto, 2000). Elles sont, pour ces raisons, appelées protéines chaperonnes. Ces protéines ont été classées en fonction de leur poids moléculaire. La plus connue faisant 70 KDa est appelée Hsp 70. la transcription des gènes Hsps est permise par le facteur de stress thermique (HSF) (Morimoto, 1998). La liaison des Hsps à des protéines co-chaperonnes module l'activation des Hsps et favorise l'interaction avec les substrats (zylicz et al., 2001).

Hsps 70 ont également un rôle déterminant au cours de l'apoptose et de la transformation cellulaire. Une expression élevée d'Hsp 70 est détectée dans plusieurs types de cancers (Jolly and Morimoto, 2000). Il a été décrit que l'effet anti-apoptotique de Hsp 70 ne modifiait ni la libération du cytochrome c ni la quantité de caspase activée en dépit d'une augmentation du nombre de cellules non apoptotiques (Jaattela et al., 1998).

7. Les différentes voies de l'apoptose

On distingue deux grandes voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose. La deuxième voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, c'est la voie des récepteurs de mort (Malissein, 2005) (Fig.13).

a. La voie mitochondriale ou intrinsèque

La mitochondrie est un organite présent dans la majorité des cellules eucaryotes. Elle possède une double membrane, un génome circulaire et des systèmes propres de transcription/ traduction. Elle a trois fonctions principales : la production d'énergie, la génération d'espèces réactives oxygénées et la régulation de l'apoptose. Il est clairement décrit que la mitochondrie est un des acteurs principaux de l'apoptose (Green and Kroemer, 1998).

La première perturbation cellulaire est la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), suivie par la libération des facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c, les pro-caspases-2,-3,-8 et -9, Smac/ DIABLO « second mitochondrial activator of caspases »/ « direct IAP binding protein with low PI » l'AIF « apoptosis inducing factor », et l'endonucléase G (Parone et al., 2002).

a. 1. La voie mitochondriale caspase-dépendante

Une première classe de Soluble Inter-membrane Mitochondrial Proteins (SIMP) agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue notamment le cytochrome c et la protéine Smac/DIABLO (Keilin, 1930). Le cytochrome c est synthétisé dans le cytosol sous la forme d'apo-cytochrome c et transloqué dans la membrane externe mitochondriale. Il est ensuite transformé en un holo-cytochrome c suite à son attachement à un noyau hème (Zhivotovsky et al., 1998). Le cytochrome c participe à l'assemblage de l'apoptosome. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apoptosis promoting activated factor-1 (Apaf-1), et la pro-caspase 9, via des domaines CARD ; ils forment ainsi un complexe multiprotéique à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et donc à son activation. Cette dernière activera à son tour des caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7 (Slee et al., 1999).

La libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome ne sont pas les seuls mécanismes aboutissant à l'activation en cascade des caspases. La protéine murine Smac et son orthologue humain DIABLO sont des protéines mitochondriales synthétisées sous la forme de précurseurs de 29 kDa ; après protéolyse, elles deviennent des protéines

matures de 23 kDa, pouvant être libérées en réponse à un stimulus apoptotique (Verhagen et al., 2000). Elles agissent sous forme de dimères et contribuent à l'activation des caspases en séquestrant les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs : inhibitors of apoptosis). Leur fonction physiologique mitochondriale est inconnue (Malissein, 2005).

a. 2. La voie mitochondriale caspase-indépendante

L'AIF « apoptosis inducing factor » est une flavoprotéine (Ameisen, 2002). Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois introduit dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il est clivé et libère une protéine mature de 57kDa. Cette protéine a une double fonction de NADPH oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène (Klein et al., 2002 ; Mate et al., 2002). Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit, en coopération avec les endonucléases (notamment l'endonucléase G), le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires de 50kpb (Susin et al., 1999).

L'endonucléase G est une endonucléase mitochondriale codée par la réplication du génome nucléaire et son rôle principal est d'être impliqué dans la réplication du génome mitochondrial. Durant l'apoptose des cellules de mammifères, l'endonucléase G est relarguée par la mitochondrie, transloquée vers le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li et al., 2001 ; Van Loo et al., 2001).

b. La voie de récepteurs de mort ou extrinsèque

Elle est initiée par des ligands de mort extracellulaires de la famille du TNF tel que, FasL/CD95L « fibroblast-associated ligand », et TRIL « TNF-related apoptosis-inducing ligand ». Ces ligands se lient à des récepteurs de mort situés à la surface membranaire. Les récepteurs les plus décrits appartiennent à la famille du TNF-R (Borner, 2003).

La fixation du ligand sur les récepteurs entraîne leur trimérisation. Grâce à un domaine d'environ 80 acides aminés (le domaine de mort ou DD pour « death domain »), les récepteurs trimérisés recrutent, dans le cytoplasme, une protéine adaptatrice telle que TRADD « TNF-R1 associated protein with death domain » ou FADD « Fas associated protein with death domain ». Ces protéines adaptatrices se lient à la caspase-8 (caspase initiateur) pour former le DISC « death-inducing signaling complex » ou casposome. Via un domaine DED « death effector domain ».

La proximité de TRADD ou FADD stimule l'autoprotéolyse/activation de la pro-caspase-8. la caspase-8 activée est libérée du DISC et active alors les caspases effectrices-3, -6 et -7 pour amplifier le signal de mort. Cette voie peut être bloquée par : 1- des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), 2- par des inhibiteurs de caspases, 3- par des FLIP « FLICE-inhibitory protein », protéines homologues de la caspase-8 qui contiennent un domaine DED pour se lier à FADD sans pouvoir servir d'intermédiaire entre le signal apoptotique et les caspases effectrices. Ces FLIP ne sont pas des caspases initiateurs (Medema et al., 1997 ; Thome et al., 1997)

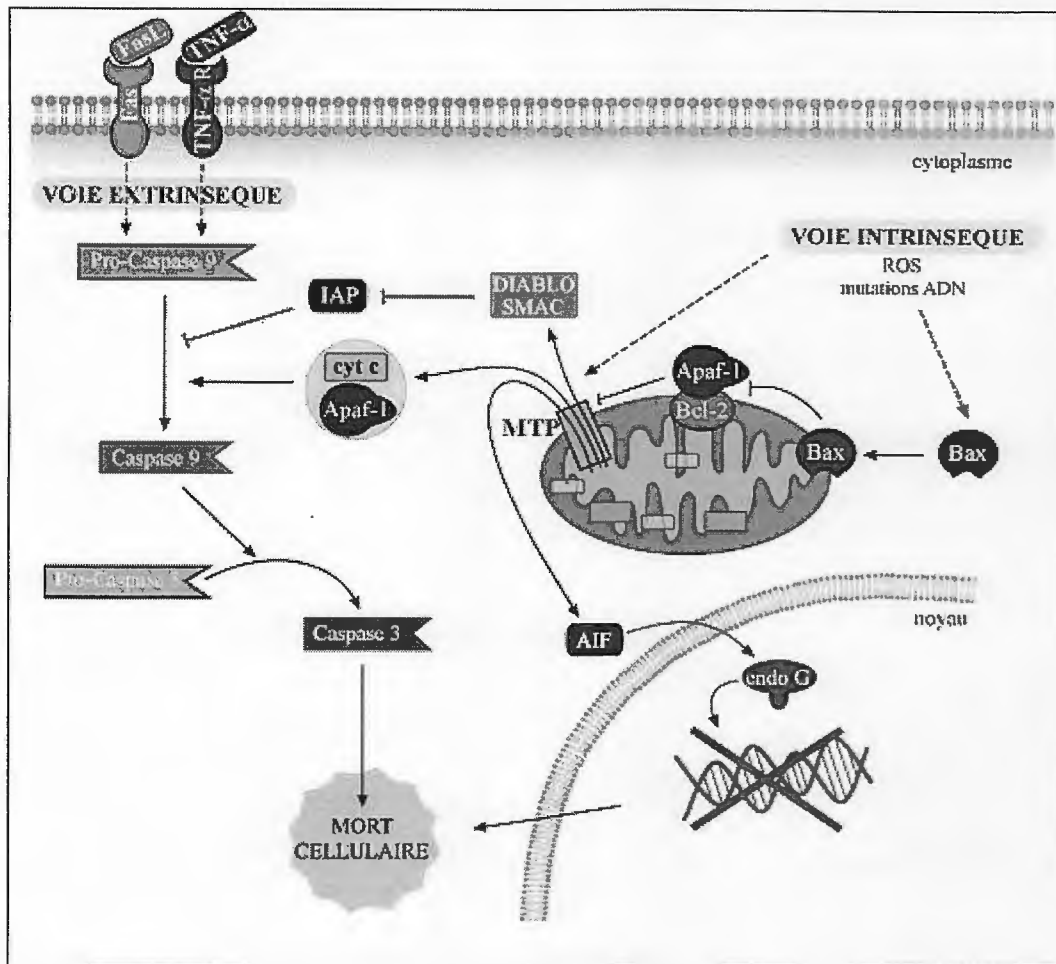


Fig. 13 : Les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. (Emre, 2007).

8. Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Les IAP ont été décrites pour la première fois à partir de génomes de baculovirus, par l'équipe de Miller en 1993 (Crook et al., 1993). Cette découverte a permis d'identifier deux motifs conservés dans les IAP : un domaine (répété 1 à 3 fois) appelé BIR (Baculovirus IAP Repeat) et un domaine d'interaction protéine-protéine contenant un atome de Zinc nommé RING « RING finger ». Toutes les IAPs possèdent le domaine BIR et il est essentiel à leurs propriétés anti-apoptotique (Hinds et al., 1999 ; Miller, 1999) alors que seules quelques-unes des IAPs possèdent un domaine RING. On a identifié 8 IAPs chez l'homme et seulement 5 contiennent le domaine RING. XIAP « X-linked IAP » est le nombre le mieux caractérisé. Les IAPs agissent soit en bloquant l'activation des pro-caspases, soit en inhibant l'activité des caspases matures. Enfin, l'activité des IAPs ne semble pas se limiter à l'inhibition des caspases car elles interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire et dans des cascades de signalisation caspases-indépendantes (Levkau et al., 2001 ; Silke and Vaux, 2001).

9. Apoptose et cancer

La conception moderne des maladies cancéreuses est elle de l'envahissement tissulaire par des cellules caractérisées par une grande instabilité génétique et une prolifération incontrôlée. La labilité génétique facilite l'apparition et la sélection d'anomalies qui, associées, concourent à l'avantage sélectif de la cellule maligne. Outre une activation de mécanismes oncogéniques et une inhibition de signaux freinateurs de prolifération, on retrouve presque constamment dans les cellules cancéreuses une diminution de la sensibilité à l'apoptose (Evan et al., 1998). Celle-ci peut résulter à la fois, et éventuellement en même temps, de l'exacerbation des fonctions anti-apoptotiques et de l'inactivation des effecteurs de l'apoptose. L'induction de l'apoptose de cellules cancéreuses constitue donc une stratégie thérapeutique parfaitement logique. Celle-ci est cependant rendue de mise en œuvre difficile par la nécessité d'induire une destruction sélective des cellules cancéreuses, c'est-à-dire d'épargner les nombreuses cellules normales qui sont elles aussi sensibles à l'apoptose.

Chapitre III

III. Cytométrie, stress oxydatif et apoptose

1. Applications de la cytométrie en flux dans le cas du stress oxydatif

1. 1. Mesure des espèces radicalaires de l'oxygène

Il y a plusieurs méthodes pour mesurer les radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules (Curtin et al., 2002). L'utilisation en cytométrie en flux des dérivés du diacétate de 2',7'- dichlorodihydrofluorescéine (H₂ DCF-DA) est une technique efficace dans l'évaluation de l'état d'oxydoréduction de la cellule. Des estérases cellulaires transforment le H₂ DCF-DA en 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (H₂ DCF), qui est une molécule chargée non fluorescente qui ne traverse pas la membrane de la cellule, par clivage de groupes d'acétate. L'oxydation de ce dernier en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) par les peroxydases, le cytochrome c ou le Fe²⁺ peut se réaliser en présence du peroxyde d'hydrogène (Tammariello et al., 2000), (Fig14).

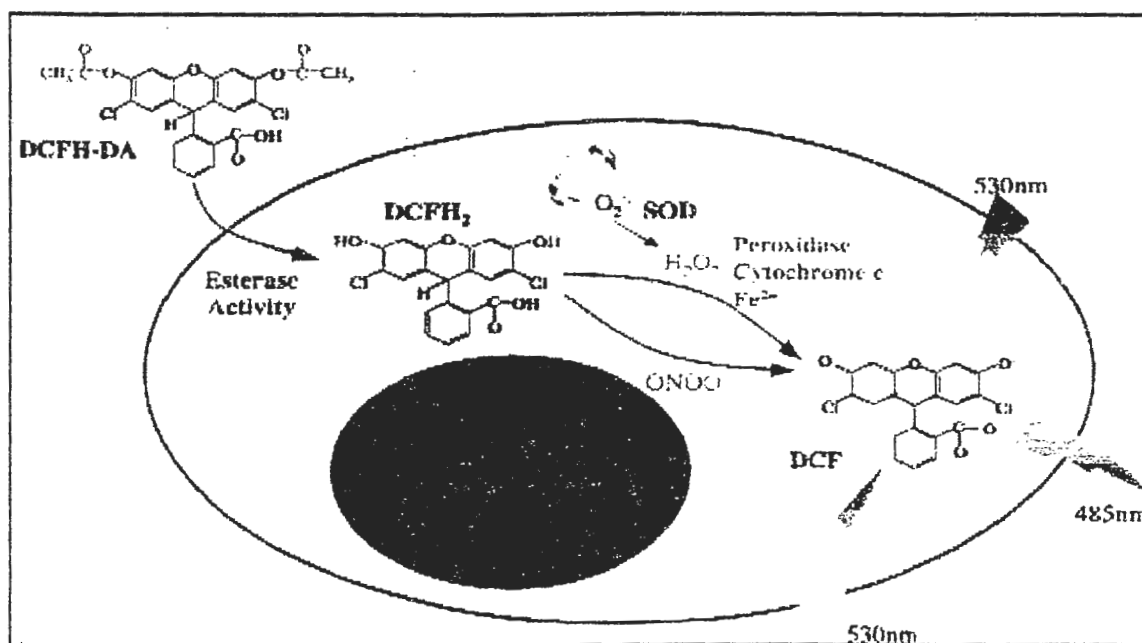


Fig. 14: Mécanisme d'action du 2',7'- dichlorodihydrofluorescéine (HDCF-DA) (Curtin et al., 2002).

On mesure la production de deux produits importants du stress oxydatif, l'anion ou radical superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à l'aide du marquage fluorescent : le H₂ DCF DA (5-(6) 2',7'- dichlorodihydrofluorescéine diacétate, acetyl ester (C₂₇ H₁₉ Cl₂ O₈ ; MM : 577,8) (Molecular Probes, Invitrogen, France) selon le protocole proposé par Chen et al., (2003a) (Fig. 15).

De 0,5 à 1.10⁶ cellules sontensemencées, traitées avec les molécules d'intérêt, prélevées par trypsinisation à différents points de temps et centrifugées à 900g, 5 min à 4°C. Après un lavage au tampon phosphate salin (PBS) 0,1M pH 7,2, les cellules sont remises en suspension dans du PBS préchauffé à 37°C contenant 8,5 μM du CM-H₂ DCF

DA (dilution 1/200 du stock 1,7 mM/éthanol) et mises en incubation 30 min à l'obscurité comme contrôle positif, on utilise le H_2O_2 . Le H_2O_2 est ajouté à 3% (V/V) dans le milieu de culture d'un groupe non traité ; 30 min avant l'étape de la trypsinisation.

La fluorescence verte émise (FL-1) suite à l'oxydation du DCF, est détectée par cytométrie en flux et analysée pour 10.000 cellules / échantillon (Chen, 2003).

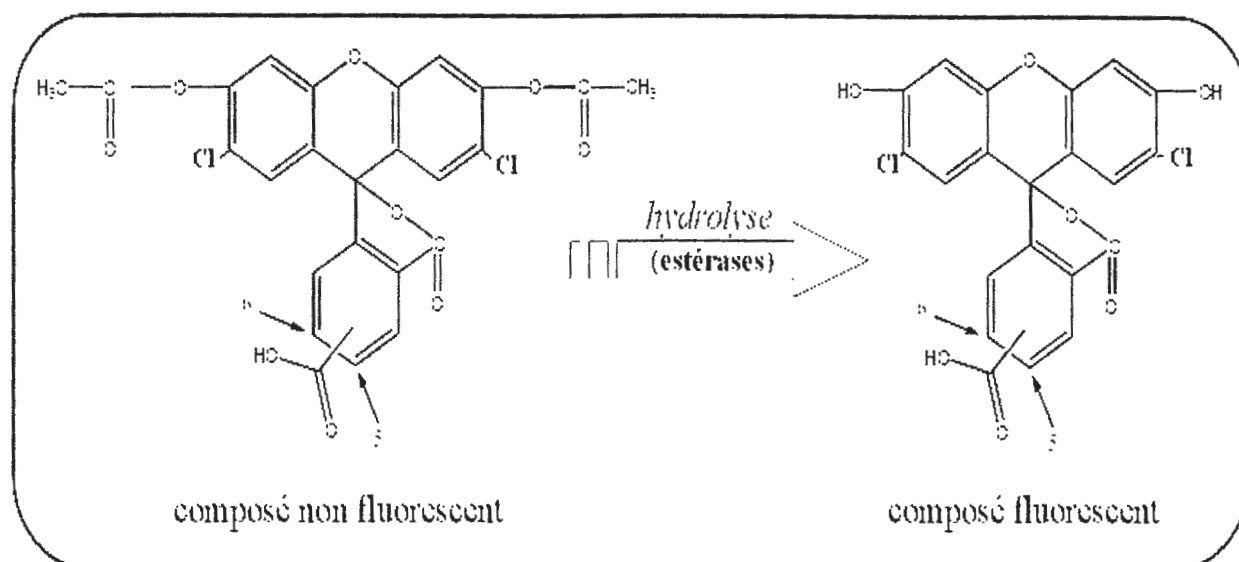


Fig. 15: Formules chimiques du 5(6)-DCFDA avant et après hydrolyse par les estérases (Gregori, 1992).

1. 2. Mesure de la peroxydation lipidique

En partant du principe que la fluorimétrie permettait d'étudier la peroxydation lipidique sur une large population cellulaire, sans donner accès à l'échelle de la cellule, Makrigiorgosont et al., (1997) ont développé une méthode fondée sur la cytométrie de flux. Pour cela, la 5-(N-dodécanoyl) aminofluoresceine (C11-fluor), un dérivé lipophile de la fluorescéine commercialement, disponible a été incorporé au sein de membranes d'érythrocytes. L'oxydation de la C11-fluor induite par l'hydroperoxyde de Cumène, s'accompagne d'une extinction graduelle de fluorescence. Dans ce test, le Trolox (équivalent hydrophile de l' α -tocophérol, fig.16) ou l' α -tocophérol inhibent clairement la peroxydation lipidique lorsqu'ils sont incubés avec les cellules, comme en témoigne le ralentissement continu de la cinétique d'extinction de fluorescence. Cependant, la condition sine qua none pour une application courante de cette méthode à la détection de l'oxydation de sous populations cellulaires spécifiques est que la sonde fluorescente ne soit pas échangeable d'une cellule à l'autre (Amre et al., 2004).

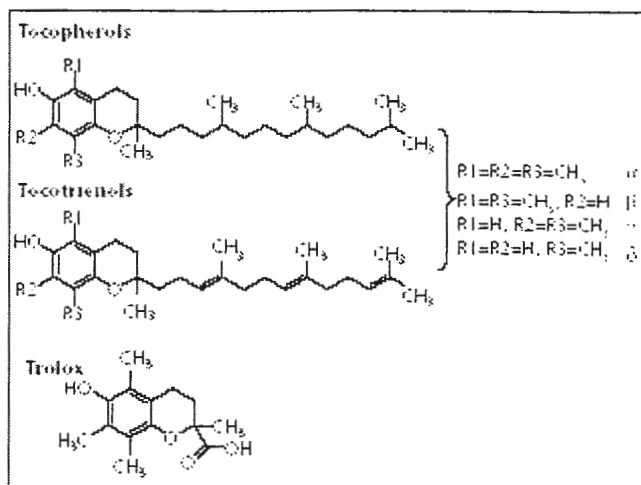


Fig. 16 : Structure chimique des tocophérols, des tocotriéonols et du trolox (Makrigiorgosont et al., 1997).

En effet, si l'échange peut avoir lieu, la différence de peroxydation entre les cellules ne pourra pas détectée. Dans cette optique, Maulik et al., (1998) ont examiné et comparé quatre fluorescéines lipophilisées ; la C11-fluor, la 5-héxadécanoyl aminofluoresceine (C16-fluor), la 5-octadécanoyl aminofluoresceine (C18-fluor) (Fig.17a), et la dihéxadécanoyl glycérophosphoéthanol aminofluoresceine (fluor-DHPE, fig. 17b). Parmi elles, seule la fluor-DHPE, s'est avérée être une sonde non échangeable. Cette méthodologie a par la suite été appliquée à l'étude de l'efficacité antioxydante de l' α -tocophérol et des acides ascorbiques et uriques vis -à -vis des membranes cellulaires d'érythrocytes marquées au C11-fluor et oxydées par l'hydroperoxyde de cumène (Chung et al., 2000). Les résultats indiquent que l' α -tocophérol est l'antioxydant le plus efficace, mais également que l'ascorbate stoppe la propagation en chaîne, probablement par un mécanisme de recyclage redox du radical tocophéroxy (Amer et al., 2004).

En 2004, Amer et al., ont utilisé la fluor-DHPE pour marquer les membranes d'érythrocytes de donneurs normaux et de patients thalassémiques (maladie génétique liée à une déficience de la synthèse de l'hémoglobine). La mesure du degré de l'oxydation induite par H₂O₂ a été réalisée par cytométrie de flux et a montré que les cellules des patients thalassémiques y étaient plus sensibles.(Amer et al., 2004).

En termes d'avantages, la longueur d'onde d'excitation de ces sondes (488 nm) semble particulièrement bien adaptée à la fois aux cellules mais également à une utilisation courante en cytométrie de flux qui utilise généralement un laser émettant à cette même longueur d'onde. En outre, la fluor-DHPE mine relativement bien les lipides membranaires. Globalement, la méthode en donnant accès à l'échelle de la cellule individuelle ou de la sous-population est un outil, certes coûteux et complexe à mettre en œuvre, mais particulièrement précieux pour les chercheurs. À notre en connaissance, le seul inconvénient que l'on puisse révéla est que cette méthode a «été employé uniquement sur des érythrocytes. Il serait souhaite à l'avenir de confirmer que la fluor-DHPE est une sonde suffisamment sensible pour être utilisée avec d'autres types cellulaires (Amer et al., 2004).

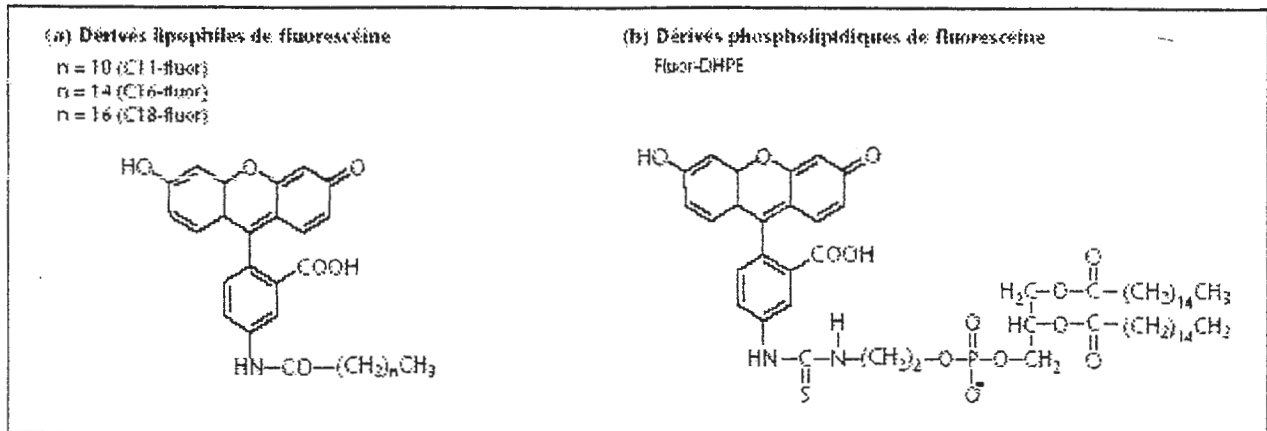


Fig. 17 : structure chimique des dérivés lipophiles (a) et phospholipidiques (b) de la fluorescéine (Maulik et al., 1998).

2. Dans le cas de l'apoptose

2.1. Mesure de la fragmentation de l'ADN

La cytométrie en flux permet de caractériser la distribution des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, à savoir les phases G_0/G_1 , S, G_2/M en mesurant la quantité d'ADN présent dans la cellule au cours de son développement. Chaque pic donné par le cytomètre correspond à une population cellulaire accumulée à une phase donnée. Lors du processus apoptotique, il y a fragmentation de l'ADN et les cellules apoptotiques contiennent alors une quantité d'ADN inférieure à $2n$ (Nicoletti et al., 1991).

Les cellules apoptotiques peuvent être détectées par cytométrie en flux en utilisant après perméabilisation, un fluorochrome marquant l'ADN, tel que l'iodure de propidium (IP, Fig.18), qui se fixe au niveau des ADN en s'intercalent entre les bases sans affinité particulière pour des séquences spécifiques et avec une stoechiométrie d'une molécule de pH pour 4 à 5 paires de bases. La réduction de la fluorescence de IP dans les cellules apoptotiques pourrait résulter de changements chromatines (modifiant l'accèsibilité du fluorochrome à l'ADN), mais elle est surtout due à une diminution de leur contenu en ADN après perméabilisation cellulaire. En effet, après perméabilisation, les cellules apoptotiques caractérisées par une fragmentation de l'ADN perdent les oligo ou mono nucléosomes formés. L'ADN qui reste dans les cellules apoptotiques est probablement constitué par des fragments d'ADN formant des boucles ancrées à la matrice nucléaire, ou dont la taille interdit leur diffusion hors de la cellule. Notons qu'aux stades tardifs de l'apoptose, la formation des corps apoptotiques (contenant des fragments d'ADN) conduit aussi à réduire la quantité d'ADN dans les cellules apoptotiques (Jean et al., 2003).

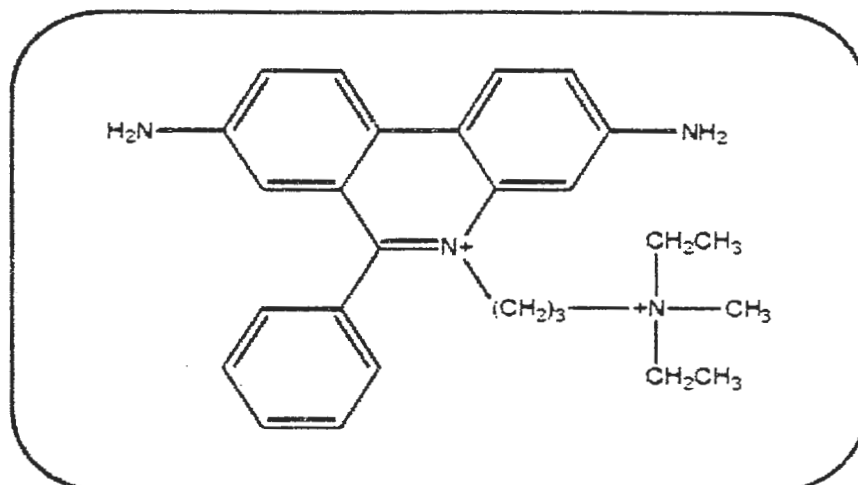


Fig. 18 : Structure chimique de l'iodure de propidium (Gregori, 1992).

Le cytomètre détecte une fluorescence émise réduite et la population cellulaire s'accumule dans une région inférieure à G₀/G₁, appelée sub G₁ (Fig. 19) (Nicoletti et al., 1991) correspondant aux cellules apoptotiques. Par opposition à ces derniers, les cellules nécrotiques ne sont pas caractérisées par une réduction immédiate de l'intensité de la fluorescence liée à l'IP.

Cependant, les cellules en apoptose très précoce, dont l'ADN n'est pas suffisamment fragmenté, n'ont pas encore perdu d'ADN ne sont donc pas détectées par cette technique (Jean et al., 2003).

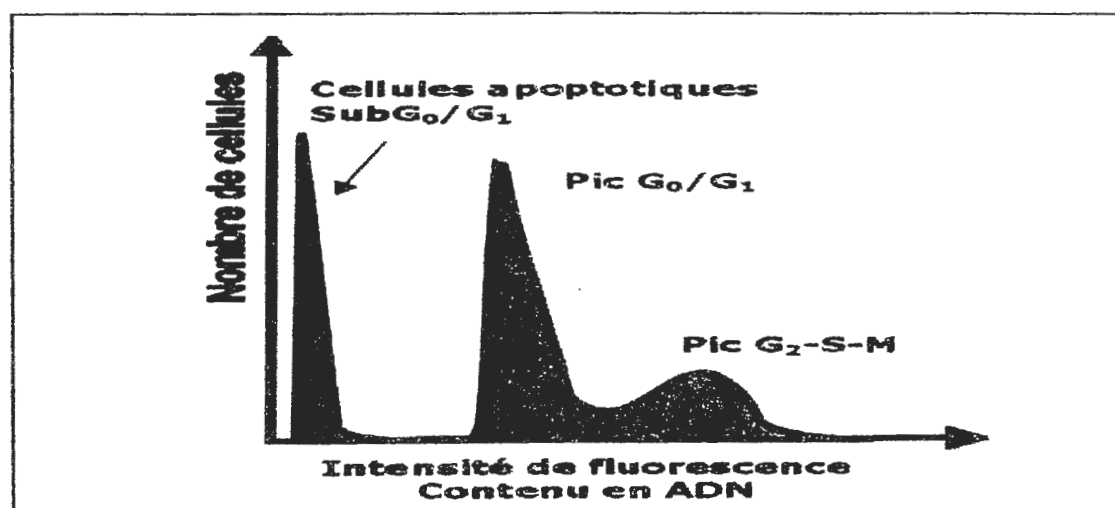


Fig. 19 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (Nicoletti et al., 1991).

2.2. Détection des phosphatidylsérines

Le processus apoptotique s'accompagne de modifications morphologiques dont parmi elles, la formation des fragments cytoplasmiques et nucléaires : les corps apoptotiques. Suite à ces remaniements structuraux, il y a exposition des phosphatidylsérines (PS) vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Koopman et al., 1994 ; Vermes et al., 1995)(Fig. 20).

Ces phospholipides anioniques sont présents dans le feuillet interne de la membrane plasmique, ainsi lors de la formation des corps apoptotiques, ils sont exposés à la face externe par translocation. Il est possible de détecter l'externalisation des PS par marquage des cellules à l'annexine V couplée à la FITC (Koopman et al., 1994 ; Vermes et al., 1995).

L'annexine V est une protéine calcium-dépendante de haute affinité pour les phosphatidylsérines. Un double marquage à l'annexine V- FITC et à l'iodure de propidium de cellules non fixées et non perméabilisées conduira à 4 cas de figures :

- Les cellules non marquées ni à l'annexine V ni à l'iodure de propidium correspondent aux cellules qui ne sont pas en apoptose et qui sont vivantes.
- Les cellules marquées uniquement à l'annexine V correspondent aux cellules en apoptose précoce.
- Les cellules marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium sont des cellules en apoptose avancée ou nécrotiques (Darzynkiewicz et al., 1997). Les cellules nécrotiques peuvent également exposer les PS suite à la perte de l'intégrité membranaire (Roussi, 2006).
- Les éléments uniquement marqués par l'iodure de propidium correspondent à des débris d'acides nucléiques (Darzynkiewicz et al., 1997).

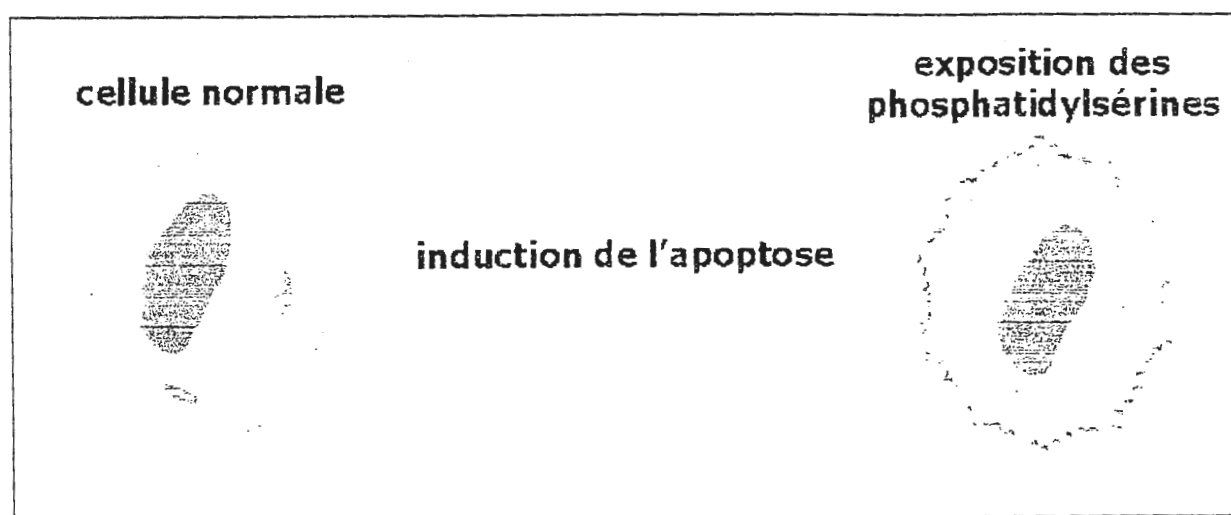


Fig. 20 : Externalisation des phosphatidylsérines au cours de l'initiation de l'apoptose (Koopman et al ., 1994 ; Vermes et al., 1995).

2.3. Mesure de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax

Les protéines Bcl-2 et Bax font partie de la famille des protéines Bcl-2 qui sont des régulateurs de l'apoptose (Lucken-Ardjonande et al., 2005). Les taux d'expression des deux protéines peut déterminer l'état physiologique d'une cellule : la survie ou l'apoptose. La surexpression de la protéine Bcl-2 peut inhiber l'apoptose alors que la surexpression de la protéine Bax peut la favoriser (Aggarwal et al., 2004). La détection de leur expression est réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifique couplés au FITC (Roussi, 2006).

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sontensemencées et traitées avec ou sans les hydroxystéroïls pour différentes périodes de temps. La détection des protéines intracellulaires nécessite la fixation et la perméabilisation des cellules. Pour ceci, le Kit de fixation/perméabilisation BD cytofix/cytopermTM (pharmingen, BD Biosciences, San Joes, USA) est utilisé. Les cellules sont récupérées par trypsinisation, lavées dans du PBS $0,1M$ pH $7,2$ est centrifugées 5 min à $900g$, $4^{\circ}C$. Le culot est remis en suspension dans $250 \mu l$ de la solution de fixation/perméabilisation fournie par le Kit et incubé pendant 20 min à $4^{\circ}C$. Suite à deux lavages dans du tampon $1x$ BD per/WashTM et centrifugées 5 min, $900g$ à $4^{\circ}C$, les cellules sont incubées avec des anticorps spécifiques. Les dilutions nécessaires sont réalisées dans le tampon $1x$ BD per/WashTM :

- Pour la détection de la protéine Bcl-2 : $20 \mu l$ de l'anticorps monoclonal de souris anti-hBcl-2 couplé à la FITC (clone Bcl-2/100, BD pharmingen, USA) sont incubés avec les cellules pendant 30 min à $4^{\circ}C$ et à l'obscurité. Pour le contrôle de l'isotype, l'immunoglobuline de souris IgG1 couplée à la FITC (clone MOPC-21, BD pharmingen, USA) est utilisée dans les mêmes conditions que l'anti- Bcl-2.

- Pour la détection de la protéine Bax : l'anticorps polyclonal de lapin anti-hBax (BD pharmingen, USA) ($10 \mu l$, dil. $1/100$) et le fragment f(ab')₂ de porc anti-immunoglobuline de lapin couplé à la FITC (Darkocytomation, Glostrup, Denmark) ($10 \mu l$ dil. $1/100$) sont utilisés dans les mêmes conditions que pour la détection de la protéine Bcl-2. Entre le premier et le second anticorps, il y a une étape de deux lavages dans du tampon $1x$ BD perm/WashTM (Roussi, 2006).

A la fin des incubations avec les anticorps couplés à la FITC, les cellules sont lavées avec le tampon $1x$ BD per/WashTM.

Pour l'analyse au cytométrie en flux, le culot est repris dans $200 \mu l$ du même tampon ou PBS préchauffé. La fluorescence verte émise est détectée par FL-1 pour un échantillon de 10.000 cellules (Roussi, 2006).

2.4. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) établi au niveau de la membrane interne charge la chambre interne ou matrice négativement et la chambre externe positivement. La perturbation du potentiel membranaire peut conduire à l'ouverture des canaux mitochondriaux, qui a pour conséquence l'établissement de l'équilibre des ions entre la matrice et la chambre externe et entraîner ainsi la chute du $\Delta\Psi_m$ (Poncet et al.,

2003). La mesure du potentiel membranaire mitochondrial est réalisé par CMF grâce au fluorochrome 3,3'- diethyloxocarbocyanine iodide (DioC₂ (3)) (C₂₁ H₂₁ IN₂ O₂, MM : 460,31, Molecular Probes, Invitrogen, France). Il s'agit d'une molécule cationique lipophile qui pénètre dans le cytosol des cellules eucaryotes et fluorescence en vert (530nm, FL-1) ou rouge (650nm, FL-3) suite à une excitation à 480nm. A des concentrations inférieurs à 100nm, le marquage s'accumule dans les mitochondries dont le potentiel est actif (Shapiro et al., 1979) et l'émission de la fluorescence est importante. Dans les cellules apoptotiques ou lorsque le potentiel membranaire est perturbé, l'intensité de la fluorescence du fluorochrome diminue (Roussi, 2006).

De 0,5 à 1.10⁶ cellules sontensemencées et traitées avec ou dans les hydroxystéroïls pendant différentes périodes de temps. Elles sont collectées par trypsinisation classique etlavées au PBS 0,1M pH 7,2. Le culot préchauffé à 37°C et le DioC₂ (3) est ajouté à concentration finale de 50 nM. Pour le contrôle positif, le constructeur fournit la molécule CCCP (Cyanure de 3- chloro-phényl hydrazone Carbonyl, C₉ H₅ CIN₄, MM: 204,62) qui perturbe la membrane mitochondriale, en inhibant le gradient électrochimique mitochondrial. Elle est ajoutée à 50µM en présence du DioC₂ (3). Suite à une incubation de 30 min à 37°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées avec du PBS préchauffé et centrifugées à 900g, 5 min à 4°C. Le culot est repris dans 200µl du PBS pour l'analyse au cytomètre. Les fluorescences verte et rouge émises sont capturées par les canaux « Fluorescence » : FL-1 et FL-3 respectivement pour un échantillon de 10.000 cellules (Roussi, 2006).

2.5. Détection des récepteurs membranaire

La technique de cytométrie en flux a été utilisée afin de mettre en évidence la présence de protéines au niveau des lignées cellulaires mais également pour étudier les variations d'expression de récepteurs dans différentes conditions de stimulation.

Les cellules tumorales issus de neuroblastiques ou glioblastomes humaines (SH-SY5Y, U-87 MG respectivement) sontensemencées dans les plaques de 6 puis à 2x10⁵ cellules par puis. Après adhésion des cellules, celles-ci sont mises en présence de différentes molécules, Fas L et BDNF, pendant 24 heures. Les cellules sont tout d'abord décollées de leur support de culture par ajout de versène, rincées au PBS puis comptées. Chacune des centrifugations intermédiaires est réalisée à 250 g pendant 5 min.

Deux protocoles différents sont alors été utilisés :

a)- Les cellules (2x10⁵) sont transférées dans des tubes de cytométrie puis sont saturées en PBS contenant 1,5% de l'albumine sérique bovin (BSA) pendant 15 min. l'anticorps primaire, un anticorps monoclonal anti-p75^{NTR} dilué au 1/40, ou un anticorps isotypique anti-IgG1 de souris , sont ensuite incubées pendant 15 min avec les cellules à 4°C et sont révélées par un anticorps anti-Ig de souris conjugué à FITC dilué au 1/10 pendant 10 min à 4°C. Finalement les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans du PBS.

b)- Les cellules (2x10⁵), remises en suspension dans le versène contenant 10% de Sérum de veau foetal (SVF) (V/SVF), sont disposées dans des tubes de cytométrie. Après perméabilisation des cellules grâce à du Triton x 100 dilué à 0,1% dans du PBS pendant 5 min et à 4°C, les anticorps primaires sont incubés pendant 30 min, à 4°C . Les cellules sont alors lavées en ajoutant 500µl de V/SVF puis incubées dans du V/SVF contenant un anticorps de porc anti-Ig de lapin couplé au FITC dilué au 1/100, pendant 30 min à 4°C.

Des contrôles isotypiques et des contrôles d'accrochages non spécifiques de l'anticorps secondaire ont été réalisés lors de chaque manipulation. L'analyse des marquages est réalisée grâce à un cytomètre en flux Epics XL-MCL Coulter. Chaque analyse a été réalisée sur au moins 20.000 cellules. Les résultats obtenus sont représentatifs de trois manipulations indépendantes et ont permis de déterminer les intensités moyennes de fluorescence (IMF) (Giraud, 2005).

2.5.1. Détection des récepteurs TRAIL-R

Une étude de l'expression des récepteurs de TRAIL par cytométrie en flux a été réalisée grâce à des anticorps monoclonaux anti- TRAIL-R sur les cellules glioblastomes (Fig. 21). Un décalage du pic de fluorescence a été observé avec les anticorps anti-TRAIL-R1 et R2 alors que les anticorps anti- TRAIL-R3 et R4 n'ont pas permis de détecter de protéines. Des contrôles isotypiques (en gris) ont systématiquement été réalisés et superposés aux marquages (Giraud, 2005).

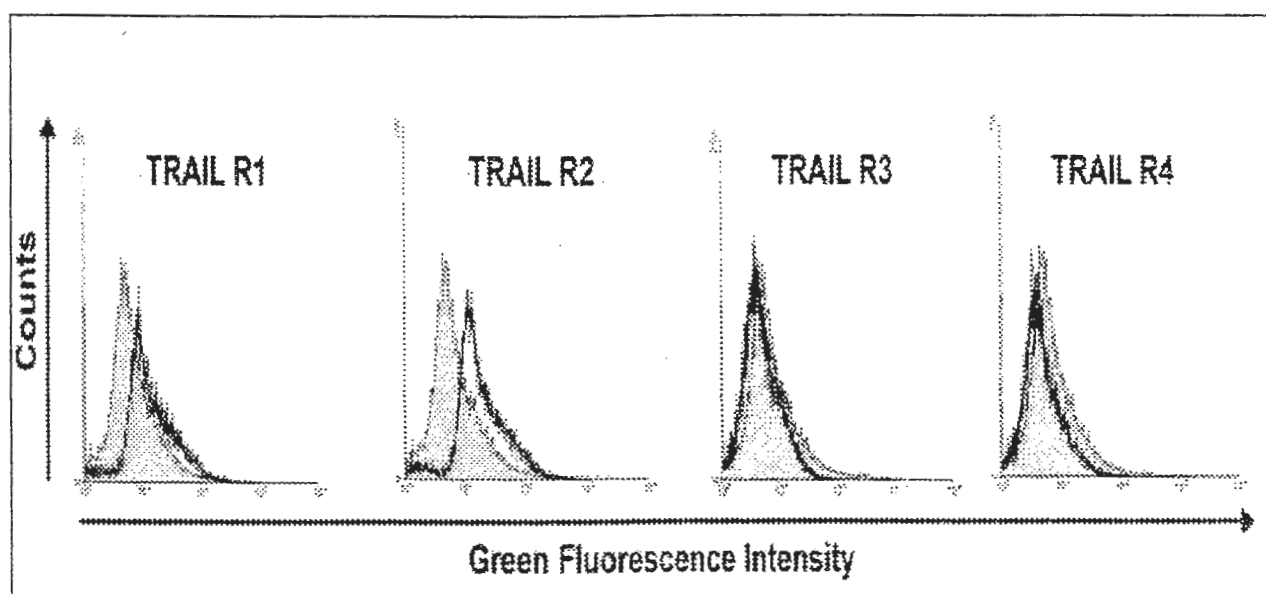


Fig. 21 : Analyse de l'expression des récepteurs de TRAIL au niveau des cellules U-87 MG par cytométrie en flux (Giraud, 2005).

Conclusion

Conclusion

Le stress oxydatif et l'apoptose sont deux phénomènes biologiques excédentaires actuellement grâce à l'utilisation de plusieurs agents toxiques à des raisons thérapeutiques ou non (tels que les médicaments anticancéreux, les rayonnements, les pesticides...).

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et prooxydants en dominance de ces derniers. Pour contrebalancer ce déséquilibre, l'organisme dispose d'une grande variété de défense enzymatique ou non enzymatique, extracellulaire, membranaire ou intracellulaire. Une fois ces systèmes échouent, le stress oxydatif provoque des altérations sur les biomolécules essentielles (lipides, ADN, protéines). Comme il conduit dans certaines situations à l'induction de l'apoptose.

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée, résulte sous l'influence d'un grand nombre de facteurs exogènes comme endogènes. Elle joue un rôle physiologique important dans l'embryogenèse, les changements morphologiques, l'homéostasie cellulaire, dans la réparation des tissus mais aussi dans la régression des tumeurs. Malheureusement, le défaut de son induction ou l'excès est impliqué dans de nombreuses physiopathologies (cancers, SIDA, maladies neurodégénératives...).

Le développement des techniques de laboratoires a permis de détecter et d'évaluer les modifications des cellules vivantes dans les différentes étapes du cycle cellulaire, comme dans les altérations provoquées par le stress oxydatif et aussi l'apoptose. Parmi ces techniques on peut citer entre autres la cytométrie en flux.

En effet, la cytométrie en flux est un outil particulièrement efficace pour la biologie cellulaire et moléculaire. Cette technique permet de déterminer énormément les caractéristiques d'une suspension cellulaire telles que son état d'activation, de mutation, de prolifération, ou de mort.

Elle ouvre également un monde développé d'analyses biochimiques, pharmaceutiques et médicales, s'expliquant principalement par sa facilité et rapidité d'exécution, la possibilité d'automatisation, bonne fiabilité et sensibilité...

Pour évaluer le stress oxydatif, la cytométrie en flux est utilisée soit de façon indirecte: pour détecter la présence des ROS dans les cellules (temps de demi vie très court) en utilisant la méthode de fluorescence ou de coloration et encore pour mesurer les désordres oxydatifs dans la cellule. Soit de façon directe : par la quantification de l'ADN dans les cellules vivantes notamment dans le cas où ce stress oxydatif pourrait être à l'origine de l'apoptose.

Aussi bien, elle permet de détecter l'apoptose cellulaire, par mesure de la quantité de l'ADN et nous informe si l'apoptose est précoce ou tardive. Par ailleurs, elle mesure également la quantité des récepteurs dans les cellules apoptotiques par marquage et la quantification de flux des protéines de la famille Bcl-2, Bax, la phosphatidylsérine...

Mais comme toutes les méthodes, la cytométrie de flux reste une technique qui a des inconvénients, car elle ne peut pas être réalisée que si lorsque, toutefois, les cellules sont préalablement mises en suspension, et elle ne permet pas également de visualiser la morphologie des cellules.

Références bibliographiques

Adams J.M and Cory S (1998). the Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival science. 28:1322-1326.

Aggarawal BB, Ichikawa H (2004). Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. Cell cycle 4 :1201-15.

Alnemri ES, Livingston, DJ, Nicholson Dw, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuang J (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature, cell 87 :171.

Ameisen J.C (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death : a timeline of four billion years. Cell Death Differ. 9 : 367-393.

Amer J, Goldfarb A, Fiboch E (2004). Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. Cytom Part A. 60: 73- 80.

Asayama K., Burr IM (1985). Rat superoxide dismutases. Purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. J Biol Chem. 260 (4) : 221

Ashe PC, Berry MD (2003). Apoptotic signaling cascade. Prog Neuropsychopharmacol. Biol psychiatry 27 :199-214.

Aurousseau B (1999). Origine des défauts de couleur de carcasses ovines des aliments, 19: 515-542.

Babior (1999). NADPH oxydase. Am Updat. Blood, 93 : 1464-1476.

Baker, C.J., Deahl, K., Domek, J. et Orlandi, E.W (1997) Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: effect of DPI on the pseudo-NADPH oxidase activity of peroxidase. Biochem Biophys Res Commun. 252 (2) : 461-4.

Banci L., Benedetto M., Bertini I., Del R., Piccioli M., Viezzoli M.S (1998). Solution structure of reduced monomeric Q 133 M2 copper, Zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? Biochemistry., Vol 37(34), p. 11780-11790.

Barondeau D.P., Kassmann C.J., Bruns C.K. Tainer J.A., Getzoff E.D (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism . Biochemistry., vol 43(25), 8038-8047.

Barouki, R. et Morel, Y (2001) . Le stress oxydatif et la physiopathologie diabétique. « Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu » Palais des Congrès, Paris.

Bass DA, Parce JW, De Chatelet LR, Szedja P, Seeds MC, and Thomas M (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils. A graded response to membrane stimulation. J Immunol. 130: 1910- 1917.

Bauman J. W., Liu J., Liu YP., Klaassen CD (1991). Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. Toxicol pharmacol, 110(2): 347-354.

Beauvieux, MC., Peuchant E (2002). Le stress oxydant et ses marqueurs biologiques. Cahiers de nutrition et de diététique 37 (1) : 45-51.

Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, and Sampol J (1996). Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression. Normal adult values. Cytometry. 26: 137-147.

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

Borg J, Reeber A (2004). Les cours du PECM. Biochimie métabolique. IBSN 2-7298-7. Ellipses Edi. S.A. PARIS. p. 217-229.

Borner C (2003). The Bcl-2 protein family : sensors and check points for life or death decisions. Mol Immunol 39 :615-647.

Bors W, Heller W, Michel C, Satan M (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies. Methods in Enzymol 186: 343-355.

Boyer MJ, and Hedly DW. (1994). Measurement of intracellular pH methods cells Biol. 41: 135-149.

Boyer MT and Hedly DW (1994). Measurement of intracellular pH. Methods Cell Biol. 41:135-149.

Burent S (1999). Vue sur les mécanismes de contrôle du cholestérol hépatique suite au stress peroxydatif induit par le fer. Thèse de doctorat, montréal canada, pp. 4-24.

Brush W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, and Schulte-Hermann R. (2000). Programmed cell death-apoptosis, autophagic PCD or others? Ann. NY Acad Sci ; 926 :1-12.

Cadenas E., Bovis A., Rgan C L., Stopani AO. (1997). Production of superoxide radical and hydrogen peroxide by NaOH. Ubiquinone reductase and ubiquinol cytochrome from beef heart mitochondrial. Arch. Biochem. Biophys, 180: 248-257.

Cai L., Satoh M., Tohyama C., Cherian M.G. (1999). Metallothionein in radiation exposure : its induction and proactive role. Toxicology, Vol 132(2-3): 85-98.

Carayon P, Bord A. (1992). Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromodésoxyuridine incorporated into the DNA. J Immunol Methods. 147: 225-230.

Carvalho, H., Evelson, P., Sigaud , S., Gonzalez-flecha, B. (2004). Mitogen-activated protein kinases modulate H₂O₂-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. J. cell Biochem, 92(3): 502-513.

- Chalfie M Tu Y, Euskirchen G, Ward ww, and Prasher DC. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979).** Hydroperoxide metabolism in mamalian organs. *physiol. Rev.*, 59: 527-605.
- Chen Q, chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolem GM and alimasan A. (2003a).** The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*. 10: 323-334.
- Chu F.F., Doroshov J.H. Esworthy R.S. (1993).** Expression, caracterezation, and tissue distrubution of a new cellular selenium- dependant glutathione peroxidase, GSHPx-GL, *J. Biol. Chem.*, 268:2571-2576.
- Chung WX, Benzie FF. (2000).** Probe-associated flow cytometric analysis of erythrocyte membrane response to site specific oxidant stress . *cytometry*. 40: 182- 188.
- Clamp, AG., Ladha, S., Clark, DC., Grimble, RF., Lund, EK. (1997).** The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. *Lipids* 32 (2) : 179-184.
- Collins A. R., Browns J. Bagdanov M et al (2000).** Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a maker of oxidative damage. *Free radical Res*. 32:333-341.
- Conconi, M., Friguet, B. (1997).** Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of heat shock protein 90. *Mol. Biol. Rep*. 24 : 45-50.
- Conconi, M., Petropoulos, I., Emod, I., Turlin, E., Biville, F., Friguet, B. (1998).** Protection from oxidative inactivation of the 20S proteasome by heat-shock protein 90. *Biochem J* 333 (2) : 407-415.
- Conconi, M., Szweda, LI., Levine, R.L., Stadtman, ER ., Friguet, B. (1996).** Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch. Biochem. Biophys*. 331 (2): 232-240.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., LUNEC J. (2003).** oxydative DNA damage: mechanisms, Mutation, and disease. *FasEbj.*, Vol 17 (10), P.1195-1214.
- Coulter WH, (1956).** High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc Natl Electron Conf*, 12 :103.
- Crook NF, Clem RJ and Miller LK, (1993).** An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a Zinc finger-like motif. *J virol*. 67 :2168-74.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG, (2002).** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol methods* 265 :49-72.

- Dardik R., Varon D., Tamarin I. Et al. (2000).** Homo-cysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb Homost*, 83: 338-344.
- Darzunkiewicz Z, Robinson JP, and Crissman HA (eds) (1994a).** Flow cytometry 2nd ed. Part A. Academic Press. San Diego.
- Darzunkiewicz Z, Traganos F (1994b).** multiparameter flow cytometry in studies of the cell cycle. *Flow cytometry and cell sorting* 2nd ed (MR Melamed T, Lindmo, and ML Mendelsohn, eds). Pp 469-501. wiley- liss, New York.
- Darzunkiewicz Z, Juan G Li x, Gorczyca w, Murakami T, and Traganos F. (1997).** Cytometry in cell microbiology. Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. 27: 1-2.
- Davies M.J. (2003).** Singlet oxygen-mediated damage to protein and its consequences. *Biochem Biophys ; Res commun*, vol 305 (3). P.761-770.
- Davies, KJA. (1987).** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I- General aspects. *J Biol Chem* 262 : 9895-9901.
- Davies, MJ., Fu, S., Wang, H., Dean, RT. (1999).** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 27 (11-12) : 1151-1163.
- Davies, R.L. et Etris, S.F. (1997)** The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catal Today*. 36 : 107-114.
- Dean RT. Cheesman KH. (1987).** Vitamin E protects Proteins againt free radical damage in lipid environnement. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 148(3): 1277-1282.
- Delattre J. , Durand G., Jardillier J.C. (2003).** Biochimie pathologique Aspects moléculaires et cellulaires. *Medecine-sciences Flammarion* IBSN : 2-257-10946-5, France, p. 59-81.
- Demble, B. et Amabile-Cuevas, C.F. (1991).** Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell*. 67 : 837-839.
- Demple B, (1991).** Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet*. 25 : 315- 337.
- Deveraux Q L., Reed J. C. (1999).** IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev*; 13:239-252.
- Dolbeare F, Gratzner H, Pallaviani M, and gray jW. (1983).** Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bronodeoxyuridine. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 80: 5573-5577.

- Droge. W. (2002)** Free radicals in the physiological control of cell function. *physiol.Rev.*82: 47-95.
- Duneau M. (2005)**. Galig: un nouveau gene humain inducteur de la mort cellulaire. Thèse de doctorat de l'université d'Orléans. Pp.18-61.
- Duvall and Wyllie AH (1986)**. Death and the cell. *Immunol. Today.* 7 :115-9.
- Emre yalin. (2007)**. Influence de la protéine découplante mitochondriale UCP2 sur la signalisation et le métabolisme des macrophages. Thèse de doctorat. Pp : 17.
- Evan G., Littlewood T. (1998)**. A matter of life and cell death. *Science.* 281 :1317-1322.
- Fairbairn, DW., Olive, PL., O'Neill, KL. (1995)**. The comet assay : a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339 : 37-59.
- Fairbairn, DW., Olive, PL., O'Neill, KL. (1995)**. The comet assay : a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339 : 37-59.
- Farber J.L., Kyle M.E., Collman J.B. (1990)**. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.*, vol 62(6), p.670-679.
- Favier A. (1997)**. Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 55 (1) : 9-16.
- Favier A. (2003)**. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 108-115.
- Ferri KF, Jacotot E, Blanco J, Este JA, Zamzami N, Susin SA, Xie Z, Brothers G, Reed JC, Penninger JM and Kroemer G. (2000)**. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex : role of mitochondria and caspase. *J. EXP. Med.* 192 :1081-92.
- Fisher DE. (1994)**. Apoptosis in cancer therapy : crossing the threshold. *Cell.* 78 :539-42.
- Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. (2002)**. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2-3): 131-141.
- Flohe, L., Gunzler, WA. (1984)**. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*
- Florence L. (1990)**. Free radicals, antioxidants and cancer prevention, *Proc. Nutr. SOS. Aust.annu. Conf.*, 15: 88-93.
- Fontaine, E. (2001)**. Production et élimination des radicaux libres oxygénés.« Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu » Palais des Congrès, Paris.
- Frede SE, Valente J, Alexander JW, and Babcock GF. (1997)**. The relation ship of blood transfusion and immunosuppression with the th1/th2 paradigm: *Transplant. Proc.* 29: 1153-1154.

- Freeman BA., Crapo J.D. (1981).** Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lungs mitochondria. *J. Biol.Chem*, 256 : 10986-10992.
- Freeman B.A., Young S L., Crapo J. D. (1983).** Liposome mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cell prevents oxygen injury. *J. Biol chem.* , 258 : 12534-12542.
- Fridovich I. (1998).** the trail to superoxyde dismutase. *Proteine Sci.*
- Garatty, G. and P. Arnat. (1995).** Application of flow cytometry to transfusion. *Science. Transfusion.* 35(2) :P.157-178.
- Giraud stéphanie. (2005).** Etude d l'activation de récepteurs de mort dans les lignes neuronales et gliales humaines. Thèse de doctorat. Pp 62- 152.
- Girratì A W., 1998.** Lipid hydroperoxyde generation, turnover and effector action in biological system. *J. lipid research*, 39: 1529-1542.
- Go Y. M., Gipp J.J., Mulcahy R.T., Jones D.P. (2004).** H₂O₂ dependant activation of GCLC-ARE' reporter occurs by mitogen activated proteins kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thiredoxine-1. *J. Biol. Chem.*, 279(7): 5837-5845.
- Good M., Vasak M. (1986).** Iron (II)- substituted metallothionein: evidence for the existance of iron-Thiolate cluters. *Biochemistry*, 25(26): 8353-8356.
- Green DR, Kroemer G. (1998).** The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria. *Trends cell Bid.* 8 :267-271.
- Green DR, Kroemer G. (2004).** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 305 :626-29.
- Gregori gerald. (1992).** Ultraplancton dans la baie de marseille : Sénestemporelles, viabilité bactérienne et mesure de la respiration par cytométrie en flux. Thèse de doctorat. Pp : 71-72 .
- Greimers R. (2002).** Cytométrie en flux. Namur. (Principe de fonctionnement d'un cytomètre trieur). Université de Liège. P.3-6.
- Griffish TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR and Fergusson TA. (1995).** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 270 :1189-92.
- Grimaud, R., Ezraty, B., Mitchell, J.K., Lafitte, D., Briand, C., Derrick, P.J. et Barras, F. (2001).** Repair oxidized proteins. *J Biol Chem.* 276 (52) : 48915-48920.
- Groux H, Monte D, Bourrez JM, Capron A and Ameisen JC. (1991).** Activation of CD₄⁺T-lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induce the programmation of lymphocyte death by apoptosis. *CR Acad Scie III.* 312 :599-606.

- Grune, T., Blasig, IE., Sitte, N., Roloff, E.; Haseloff, R.; Davies, KJA. (1998).** Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J Biol Chem.* 273 : 10857–10862.
- Gueye PM (2007).** Phynotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythroctaire sur le globule rouge. Université Louis Pasteur- Srasbourg I, P. 26-48.
- Gutensohn, K. and Kuehnl (1998).** The role of flow cytometry in Improving Biocompatibility in transfusion medicine. *Transfus Scie.* 19 : P : 17-25.
- Gutteridge, JMC. (1992).** Invited review free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm* 19 : 598-620.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metal and deseases. *Biochem.* 214: 9-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985).** *Trends Neurosci.* 8: 22-26.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M; C. (1989).** Free radicals in biology and medicine. 2nded Clarendon press, Oxford, 543p.
- Halliwell B. (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev,* 52, 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC. (1999a).** Free Radicals in Biology and Medicine. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, 1999a : 1-543.
- Harber, F., Weiss, J. (1934).** the catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc A* 147 : 332.
- Harrisson R. (2002).** Structure and function of xanthine oxido-reductase: Where are we now?. *Free radic. Biol. Med.* 33: 774-797.
- Haton C. (2005).** effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinales. Thèse de doctorat, université Paris VI Pierre et Marie Curie ; PP : 43-58.
- Helmbrecht K, zeise E, Rensing L. (2000).** Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction : a review. *Cell Prolif,* 33 : 34-65.
- Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, and Day CL. (1999).** Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol.* 6: 648- 651.
- Hochgraf, E., Mokady, S., Cogan, U. (1997).** Dietary oxidized linoleic acid modifies lipid composition of rat liver microsomes and increases their fluidity. *J Nutr* 127 (5) : 681- 686.

Hong J. H., Kim M.J., Park M.R., Kwag O.G., Lee I.S., Byun B.H., Lee K.B., Rhee S.J. (2004). Effects of vitamine E on oxidative stress and membrane fluidity in Brian of Streptosoto of induced diabetic rat clin chim Acta, 340:107-115.

Hulbert A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. J theor Biol, 235: 277-288.

Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNADamage and oxygen radical toxicity. Science, vol 240(4857), p.1302-1309.

Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. (1998). Hsp-70 exerts its anti-apoptotic fonction downstream of caspase-3- like proteases. EMBO J. 17 :6124-34.

Jacquet stéphan. (2000). Dynamique des populations picoplanctoniques marines. Thèse de doctorat. PP : 58.

Januel C. (2003). Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète Etude du glutathion et du glutathionperoxydase. Thèse de doctorat. Université de Lyon I / INSA- Lyon.P. 41-56.

Jean clos, Marc coumans, Yues Muller. (2003). Biologie cellulaire et moleculaire : cycle, différenciation et mort cellulaire chez les animaux et les végétaux. P 150.

Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. (2002). Apoptosis : a linke between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 108 :153-64.

Jolly C, Morimoto RI. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. J Natl cancer Inst. 92 :1564-72.

Jones AM. (2001). Programmed cell death in development and defense. Plante physiол. 125 :7-94.

Joubert. V. (2006). Exposition in vitro des cellules neuronales au frequencies: etude de l'apoptose. Thèse de doctorat université se Limoges.P.35. 42-43.

Kamata H., Hirata H. (1999). Redox regulation of cellular signaling. Cell. Signal. 11(1): 1-14.

Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H. (1965). Spectrophotometer : new instrument for ultra rapid cell analysis, 150. (696): 630-1.

Kaynar H., Meral M., Turhan H., Keles M., Celik G., Akcay F. (2005). Glutathione peroxidase, Glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxydase, Cu-Zn superoxyde dismutase activities, total glutathione, nitric oxide and malonaldehyde levels in erythrocytesv of patients with small, cell and non-small cell lung cancer. Cancer lett., vol 28: 227(2), p. 133-139.

Keaney, JF. Jr., Schwaery, GT., Xu, A., Nicolosi RJ., Loscalzo, J., Foxall, TL., Vita, JA. (1994). 17 β-oestradiol preserves endothelium vasodilator function and limits low

desity lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 89 (5) : 2251-2259.

Kehrer, J. P. (1993), Free radicals as mediators of tissue injury and disease: *Crit Rev Toxicol*, v. 23, p. 21-48.

Keilin D (1930). Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc R Soc Lond. B* 106:418- 44.

Kerr JF, Wyllie AH, Curie AR. (1972). Apoptosis: abasic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B. J cancer* 26:239-257.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossman MP, Seburn KL, Hunrd Re, Frankel WN, Bronson RT and Ackerman SL. (2002). The lequin mouse mutation dowregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419: 367-374.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, Van Oers MH. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine exposission on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84:1415-1420.

Koropatnick J. Leibbrand M. Cherian M.G. (1989). Organ-specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiat Res* , 119(2): 356-365.

Krinsky, NI. (1989). Antioxidants function of carotenoides. *Free Rad Biol Med* 7 (6): 617-635.

Le Pape Hélène. (2003). Etude des propriétés germicides de fibres de carbone active « Application à la décontamination de l'air en cabine d'avion ». Thèse de doctorat. P.53-54. 72.

Lean, M.E.J. et Burns, J. (2001). Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. « Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu » Palais des Congrès, Paris.

LeBlanc AC. (2003). Natural cellular inhibitors ofcaspases. *Progress Neuropsychopharmacol Biol psychiatry* 27 :215-229.

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, JP., Thérond, P., Torreilles, J. (1998). Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Ann Biol Clin* 56 (3) : 305-319.

Levin, G., Cogan, U., Mokady, S. (1990). Riboflavin deficiency and the function and fluidity of rat erythrocyte membranes. *J Nutr* 120 (8) : 857-861.

Levine, RL., William, JA., Stadtman, ER., Shacter, E. (1994). Carbonyls assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233 : 346-347.

- Levine, SA., Kidd, PM. (1996).** Antioxidant adaptation. Its role in free radical pathology. San Leandro, California. Eds A. Biocurrents division, Allergy Research group.
- Levine R.L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
- Levkau B, Garton KJ, Ferri K, Nofs JR, Baba HA, Rains Ew, and Breithardt G.(2001).** xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor- kappa B: new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res.* 88: 282- 290.
- Li Ly, Luo X and Wang X. (2001).** Endonuclease G is an apoptosis DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412: 95-99.
- Liu Y., Liu J., Iszard MB., Andreus GK., Palmiter RD., Klaassen CD. (1995).** Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol appl pharmacol*, 135(2): 222-228.
- Lucie P. (2005).** Etude de la relation structure- fonction de la protéine BI-1 chez *Saccarmyces cervisies*. Thèse de doctorat, Laval QUEBEC. PP : 1-31.
- Lucken-Ardjomande S, Martinou JC (2005).** regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Bio* 328 : 616 :31.
- Lybarger L, Dempsey D, Franek K, Chervenak R. (1996).** Rapid generation and flow cytometry analysis of stable GFP. Expression cells cytometry. 25: 211- 220.
- Maftah A, Petit JM, Ratinaud MH, and Julien R. (1989).** 10- N-Nonyl-acridine orange: fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state. *Biophys. Res. Commun.* 164: 185- 190.
- Makrigiorgosont GM, Kassis AL, Mahmood A, Bum PEA, Sawides P. (1997).** novel fluorescein based flow- cytometric method for detection of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 22: 93- 100.
- Malissein Emilie, (2005).** Physiologie mitochondriale et Apoptose couplée à la signalization du récepteur à l'antigène des lymphocytes B. Thèse de doctorat, Université de Limoges. PP : 26.32.
- Mapara MY, Bargou R, Zugck C, Dohner H, Ustaoglu F, Jonker RR, Krammer PH. and Dorken B. (1993).** Apo-1 mediated apoptosis or proliferation in humain chronic B lymphocytic leukimia. Correlation with Bcl-2 oncogene expression. *Euv immunol.* 23 :702-8.
- Marnett L J.(2000).** Oxyradicals and DNA damage . *Carcigenesis*, vol 21(3), P.361-370.

- Morel T; Mermoud N; Barouki R., (1999).** An autoregulation loop controlling CYP1A1, gene expression : role of H₂O₂ and NF- κ B. *Mol cell Biol*, 19 : 6825-6832.
- Morimoto RI. (1998).** Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* 12 :3788-96.
- Moumen R., Nouvelot A., Duval D., Lechevalier D., Viader f. (1997).** Plasma superoxyde dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol sci.*, vol 151 (1), p.35-39.
- Murrell G.A., Francis M.J., Bromley L. (1990).** Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem j*, 265 (3): 659-665.
- Neuzil, J., Stocker, R. (1993).** Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* 331 (3) : 281-284.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. (1991).** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*.139: 271- 279.
- Nolan GP, Fiering S, Nicolas J, and Herzenberg LA. (1988).** Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of Escherichia Coli LacZ. *Proc. Natl. acad. Sci.USA.* 85: 2603-2607.
- Oppenheim RW (1991).** Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 453-501.
- Packer, L. (1991).** Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53 (4) : 1050S-1055S.
- Paglia DE, Valentine WN. (1967).** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70(1) : 158-169.
- Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M. (1999).** Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med* 27 (9-10) : 1080-1086.
- Parks D. A., Williams T.K. Becham J .S., (1988).** Conversion of xanthine the hydrogenase to oxydase in ischemic rat intestine : a reevaluation. *Am J physiol*, 254 : G 768-774.
- Parrone P. A. James D, Martinor JC (2002).** Mitochondria regulating the inevitable. *Biochimie* 84:105-111.
- Pelletier M, and Vallette FM. (2001).** Apoptose et maladies neurodégénératives. *La lettre du pharmacologue.* 15 :159-167.

Pelmont, J. (1993) Bactéries et Environnement : adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble (Ed.).

Pelmont J. (1995). Enzymes. Catalyseurs du monde vivant ; Presses Universitaires de Grenoble.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., Defraigne, J. (1999). Evaluation du stress oxydant : une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Coeur, Poumon* 4 : 148-154.

Pincemail J., Lecomte, J., Collart E., Castiaux, JP., Defraigne J. (2001). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* 6 (5) : 1-3.

Pincemail J., Defraigne O. (2004). Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Université de Liège, service de chirurgie cardio-vasculaire, Pro Biox SA.

Piotrowski W.J., Marczak J. (2000). Cellular sources of oxidants in the lung. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 13: 369-385.

Poncet D, Bouya P, Metivier D, Zmzami N, Kroemer (2003). Cytofluorometric Quantitation of the apoptosis-induced mitochondrial inner membrane permeabilization apoptosis. *8:521-30.*

Pryor W.A. (1986). Oxy-radical and related species their formation, lifetimes, and reaction. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667.

Rabinovitch PS, June CH, Grossman A, and Leabetter JA. (1986). Heterogeneity stimulation with PHA or anti-CD3. Simultaneous use of indo and immunofluorescence with flow cytometry. *J Immunol.* 137:952-961.

Reed JC. (2003). Apoptosis and cancer. *Cancer Medicine.B.C.D.I.nc.*

Refsgaard H.H. Tsai L., Stadtman E. R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid per oxidation products. *Proc Natl Acad. Sci USA., Vol 97 (2), P.611-616.*

Richard, MJ., Belleville, FJ. Chalas, I. Ceballos-Picot, D., Vitoux, MJ. Boyer, Chaudière J., Favier, A. (1997). Glutathion peroxydase : son intérêt en biologie clinique. *Ann Biol Clin* 55 (3) : 195-208.

Roberfroid M., Calderon P.B. (1995). Antioxidants and radical scavengers: some therapeutical uses. In : Roberfroid M., Calderon P.B. (Eds.), *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems.* Marcel Dekker : New York, 193-236.

Roederer M, D Parks, A Treister, R Stovel, M Bigos, T Nozaki, S Derosa, M Anderson, R Gerstein, and L Herzenberg (1996). Routine seven-color immunophenotypic cytometry *supp.* 8: 123.

- Ross D., Moldeus P. (1991).** Antioxidant defense systems and oxidative stress, membrane lipid oxidation, CRC press, 2: 151-170.
- Roussi Stamatiki, (2006).** Etude la signalisation cellulaire de l'apoptose induite par le 7.B-hydroxycholesterol dans les cellules cancéreuses coliques humaines. Thèse de doctorat. P65-74.
- Ryter, SW., Kvam, E., Tyrrell, RM. (2000).** Heme oxygenase activity. Current methods and applications. *Methods Mol Biol* 99 : 369-391.
- Sato M., Bremner I. (1993).** Oxygen free radicals and metalothionein. *Free radic Biol; Med.*, 14(3): 325-337.
- Schwartz A, Fernandez- Repollet E, Vogt R, and Gratama J. (1996).** Standardizing flow cytometry. Construction of a standardizing fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators: cytometry. 26: 22-31.
- Sen, CK. (2001).** Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: Introduction. *Med Sci Sports Exer* 33 (3) : 368-370.
- Servais S. (2004).** Altérations métochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard de Lyon 1, France. Pp : 19-35.138.
- Shapiro HM, Nutale PJ, Kamentsky LA (1979).** Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 5728-30.
- Shapiro HM, (1981).** Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *cytometry*. 2: 143-150.
- Shapiro HM. (1994).** Cell membrane potential analysis. *Methods cell Biol.* 41: 121- 133.
- Sies. H. (1985).** In oxidative stress; Sies ed; Academic Press (Harcourt Brace Javanovich, publishers): London, Orlando, New York.
- Sies H. (1991).** Oxidative stress: introduction. In: H Sies Ed. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. London: academic Press 1991, xv-xxii.
- Sigaud S., Evelson P., Gonzalez-flucha B. (2005).** H₂O₂ induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAPKinases. *Antioxid Redox signal.*, 7(1-2): 6-13.
- Silke J and Vaux DL. (2001).** Two kinds of BIR-containing protein inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci.* 114: 1821- 1827.
- Skowya D, Georgopoulos C, Zylicz M, (1990).** The E. coli dnaK gene product, the Hsp-70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell.* 62 :939-44.

Slater, TF. (1984). Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymol* 105 : 283-305.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano. CA, New Meyer DD Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. *J cell Biol.* 144: 281-92.

Soares F A. (2005). Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes ; adiponectine et prostaglandine. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. P.35-37.

Stadtman E.R., Oliver C.N.(1991). Metal-catalyzed oxydation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol Chem*, Vol 266 (4) P.2005-2008.

Stadtman, ER. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acids résidus in proteins by metal-catalysed reactions. *Annu Rev Biochem* 62 : 797-821.

Stewart cc.and Steroart SJ. (1994). Multiparameter analysis of leukocytes by flow cytometry. *Methods in cell biology* (Z. Darzynkiewicz J. Robinson, and H Grissman. Eds). Pp 39-60 et 61- 79. Academic press. New York.

Stubbs, CD. (1983). Membrane fluidity: Structure and dynamics of membrane lipids. In: P.N. Campbell, R.D. Marshall (eds). *Assays in Biochemistry*. Academic Press, London, 1-39.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR Aebersold R, Siderovski DP, Penninger J M and Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature.* 397:441-6.

Takahashi, K., Avissar N, Whitin, J., Cohen, H. (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 256 (2):677-686.

Tammariello SP, Quinn MT, Estus S. (2000). NADPH oxydase contributes directly to oxydative stress and apoptosis in nerve growth factor deprived sympathetic neurons. *J Neurosa.* 20: RC 53.

Tanke HJ, Nieuwenhuis IAB, Koper GJM, Stats JCM, and Ploen JS. (1980). Flow cytometry of human reticulocytes based on RNA fluorescence. *Cytometry.* 1: 313-320.

Thannickal, V J; Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen spices in cell signalling .*Am. J. physiol.* 279: L1005-L1028.

Thomas D, Pollard/William C, Earnshaw (2004). *Biologie cellulaire*, Elsevier science (USA). PP : 809.

- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fichenscher H, Meinel E, Neipl F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. (1997).** viral FLICE-inhibitory proteins. (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386 :517-521.
- Thomberry NA.(1998).** Caspases : key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5 :R97-103.
- Torreilles, J., Guerin, MC. (1995).** Freeradicals and natural or synthetic chemiluminescent systems. *C R Seances Soc Biol. Fil.* 189 (6) : 1149-1170.
- Torreilles, J., Guerin, MC. (1995).** Free radicals and natural or synthetic chemiluminescent systems. *C R Seances Soc Biol Fil.* 189 (6) : 1149-1170.
- Tsujimoto Y and Shimizu S. (2000).** Bcl-2 family: Life-or- death switch. *FEBS lett.* 466: 6- 10.
- Turrens J.F , Freeman B.A., Crapo J.D. (1982).** Hypoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 217: 411-421.
- Usatuk PV, Verpa S., Watkims T., He D., Parimandi NL and Natarajan V. (2003).** Redox regulation of reactive oxygen species-inducing P53, MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 5(6): 723-730.
- Vanloo G, schotte P, Van Gurp M, De mol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Van-dekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Van denabeele P, (2001).** Endonuclease G : a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation cell *Death Differ.* 8 : 1136-42.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ and Vaux DL. (2000).** identification of DIABLO a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102 :43-53.
- Vermes I, Haanen G, Steffens- Nakken H, Routelings- perger C. (1995).** A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluoresceine labelled Annexine V. *J Immunol Methods.* 184: 39-51.
- Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bum PNJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD et al. (1994).** Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme : a (P20/P10)₂ Homodimer cell. 78 :343-352.
- Wertz, JE. , Bolton JR. (1972).** Electron spin resonance, Mac Graw-Hill, New york.
- Wirth, D., Christians, ES ., Drion, PV., Dessy-Doize, C., Gustin, P. (2003).** Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Med. Vet* 147 : 127-144.
- Wiseman H, Halliwell B. (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, vol 313 (1), P. 17-29.

- Wolf BB and Green DR. (1999).** Suicidal tendencies : Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol chem.* 274 :20049-52.
- Wolff, S.P., Bascal, Z. A., Hunt, J.V. (1989).** Autooxidative glycosylation: Free radicals and glycation theory. *Prog. Clin. Biol. Res.* Vol, 304 p.259-275.
- Xia, T.T., Sai AL., Berka V., Zweier ,J. L., (1998).**Superoxyde generation from endothelial nitric-oxide synthase –A Ca²⁺/Calmodiulim dependant and tetrahydrodiopterin regulatory process.*J Biol Chem,* 273:25804-25808.
- Yu B.P. (1994).** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.,* 74: 139-162.
- Zachara, (1992).** Mamalian selinoproteins , *J. Trace elem.electrolytes health Dis.,* 6: 137-157.
- Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin S, Petit Px, Kroemer G. (1995).** Sequential reduction of mitochondrial membrane potential and generation of reactive hydrogen species in early programmed cell death. *J Exp. Med.* 182: 367-377.
- Zastawny T., Dabroska M., Jaskolski T., Klimarczyk M., Kulinski L., Koszela A., Sliwinska M., Witkowski P., Olinski R. (1998).** Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free radic. Biol. Med.,* vol 24(5), 722-725.
- Zelko IN., Marian TJ., Folz, RJ. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med* 33 (3) : 337-349.
- Zhivotovsky B, Hanson KP and Orrenius S. (1998).** Back to the future : the role of cytochrome c in cell death. *Cell Death Diff.* 5 : 459-60.
- Zola H, Neoh SH, Mantzious BX, Webster J, and Laughnan MS (1990).** Detection by immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High sensitivity staining and calibration of flow cytometer. *J Immunol Methods.* 135: 247- 255.
- Zylicz M, Wawrzynow A, (2001).** Insights into the fonction of Hsp-70 chaperones. *IUBMB life,* 51 :283-7.

La cytométrie de flux: Applications dans le cas du Stress oxydatif et Apoptose

Résumé

Le déséquilibre redox de la cellule, actuellement à l'origine de plusieurs pathologies et dysfonctionnements cellulaires et subcellulaires a été investi dans cette étude, tant sur le plan physiologique que sur le plan biochimique. En effet, les mécanismes de production des ROS ainsi que les systèmes antioxydants ont été investis. Par ailleurs, les retombées physiologique et pathologiques de ce phénomène ont été aussi abordées. L'apoptose en tant que mort cellulaire programmée pouvant être l'une des conséquences délétères du stress oxydatif a été documentée dans ce travail bibliographique. En fin, parmi les méthodes d'étude et d'investigation à la fois du stress oxydatif et de l'apoptose, la nouvelle technique en biologie cellulaire et moléculaire et en médecine, la cytométrie en flux a été étudiée. En effet, nous avons investi théoriquement cette méthode que l'on considère un outil rapide et efficace dans l'évaluation des dégâts du stress oxydatif et de l'apoptose.

Mots clés: ROS ; Stress oxydatif ; Apoptose ; Cytométrie en flux.

Abstract

The redox imbalance of the cell, currently the source of several diseases and cellular and subcellular dysfunctions has been invested in this study, both physiological and at the biochemical. Indeed, the mechanisms of production of ROS and systems antioxidants have been invested. In addition, physiological and pathological repercussions of this phenomenon were also discussed. Apoptosis as programmed cell death may be one of the deleterious consequences of oxidative stress was documented in the literature work. In the end, among the methods of study and investigation of both oxidative stress and apoptosis, the new technology in cellular and molecular biology and medicine, flow cytometry has been studied. Indeed, we invested in theory, this method is considered a quick and effective tool in assessing the damage of oxidative stress and apoptosis.

Keywords: ROS; Oxidative stress; Apoptosis; flow cytometry.

ملخص

إن اختلال توازن الأوكسدة للخلايا في الوقت الراهن، يعتبر مصدر العديد من الأمراض و الإختلالات الوظيفية الخلوية وتحت خلوية، و الذي قد تم استثماره في هذه الدراسة، سواء على المستوى الفسيولوجي أو البيوكيميائي. وبالفعل، فأنا قد تطرقنا الى آليات إنتاج الأنواع الفعالة للأوكسجين و مضادات الأوكسدة. بالإضافة الى ذلك، فإن العواقب الفيزيولوجية و المرضية المترتبة على هذه الظاهرة قد نوقشت أيضا. الأبوبتوز باعتبارها الموت المبرمج للخلايا بإمكانها أن تكون واحدة من العواقب الوخيمة للجهد المؤكسد الموثق في هذا العمل النظري. وفي نهاية المطاف، ومن بين أساليب الدراسة والتحقيق في الجهد المؤكسد و الموت الخلوي المبرمج، فإن التكنولوجيا الجديدة في مجال البيولوجيا الجزيئية والخلوية و الطب، قد عرفت تقنية قياس تدفق الخلايا و التي تمت دراستها. والواقع أننا استثمارنا نظريا، اد أن هذا الأسلوب يعتبر وسيلة سريعة وفعالة في تقييم الأضرار الناجمة عن الجهد المؤكسد والأوبتوز.

الكلمات المفتاحية: الأنواع الفعالة للأوكسجين؛ الجهد المؤكسد؛ أبوبتوز؛ تقنية قياس التدفق الخلوي.