



Espèces Activées de l'Oxygène et de l'Azote, Radicaux Libres et Stress Oxydant : du Meilleur (protection de l'organisme)... au Pire (inflammations, maladies auto-immunes et cancers)

Christian Amatore, HonFRSC, HonFCCS, FISE, FECS, FCE

*Directeur de Recherche Emérite au CNRS, XiaDa Distinguished Professor
Ecole Normale Supérieure, UMR 8640, CNRS, PSL & Sorbonne Université, Paris, France
Xiamen University, State Key Laboratory PCOSS, Xiamen, China
LIA CNRS "NanoBioCatEchem" (ENS, Rennes 1, Xiamen, Wuhan)*





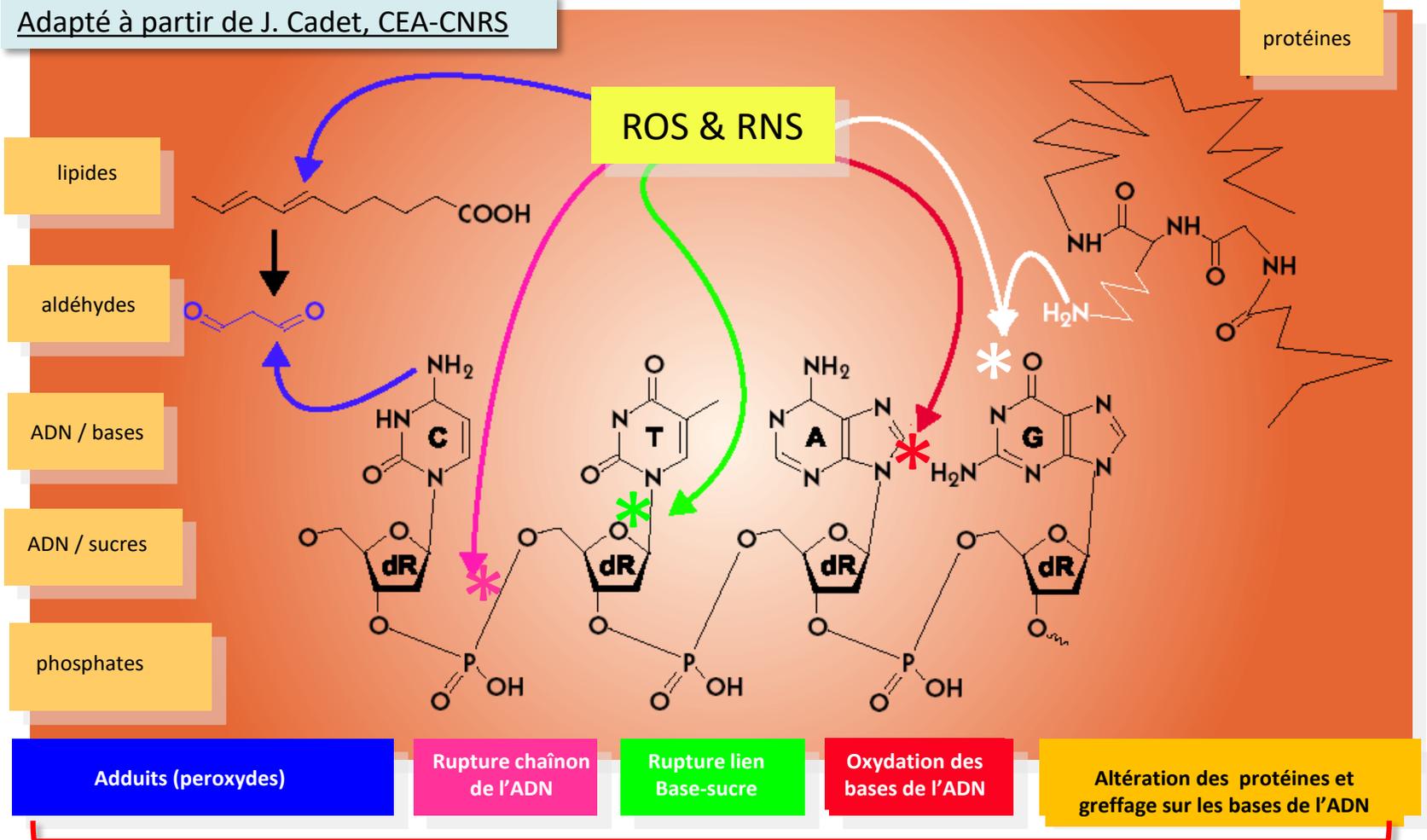
Espèces Activées de l'Oxygène et de l'Azote, Radicaux Libres et Stress Oxydant : du Meilleur (protection de l'organisme)... au Pire (inflammations, maladies auto-immunes et cancers)

I. Stress Oxydant : Génération Intracellulaire des Espèces Activées de l'Oxygène (ROS) et de l'Azote (RNS)



Stress Oxydant et Dommages Intracellulaires

Adapté à partir de J. Cadet, CEA-CNRS



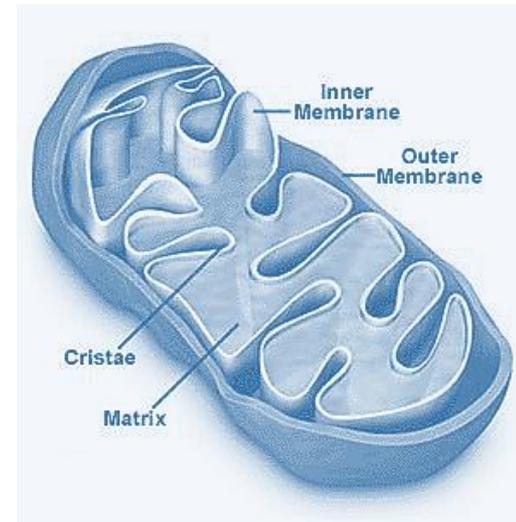
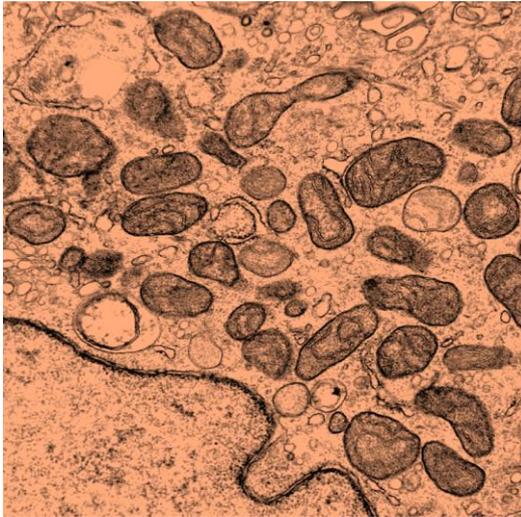
Déficiences des mécanismes Cellulaires

Mutations

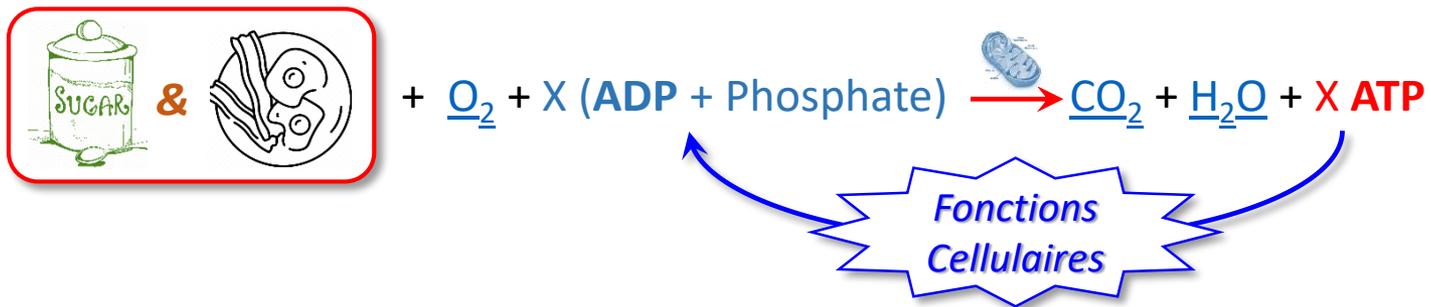
Mort Cellulaire

Commande de l'Apoptose

☐ Stress Oxydant et Energie : *La Mitochondrie*



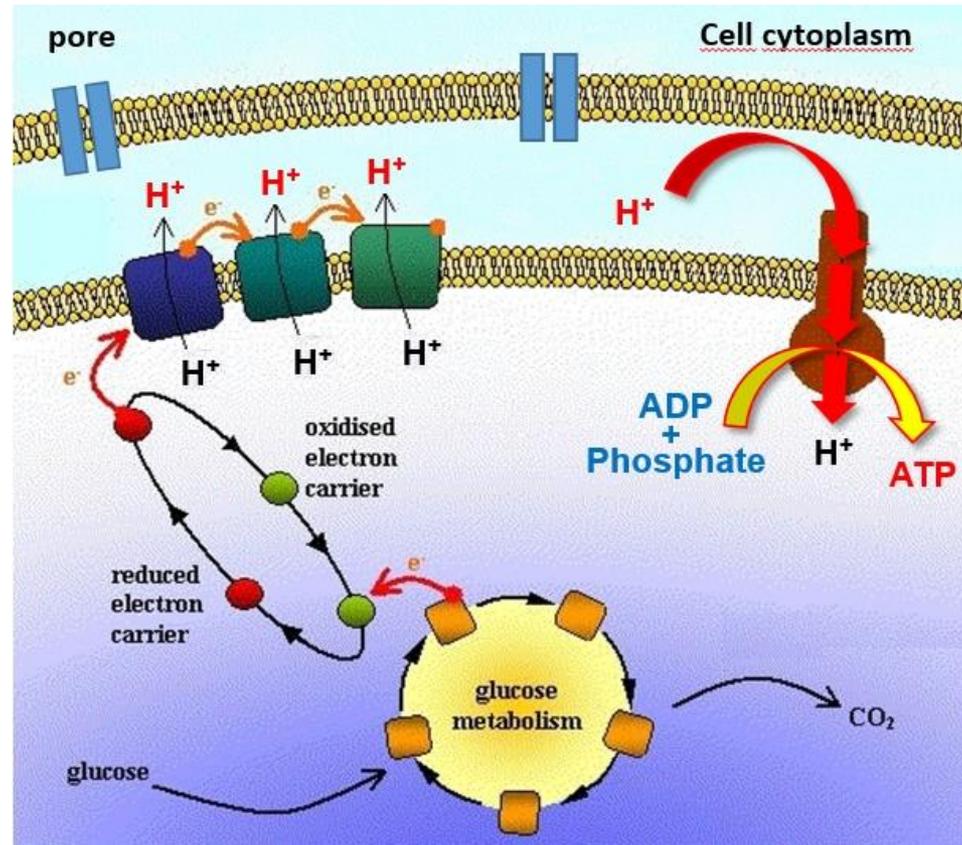
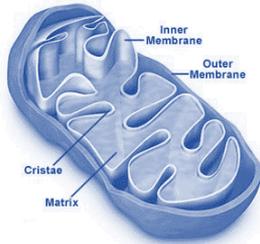
*Les Mitochondries produisent l'ATP, un Vecteur énergétique majeur des cellules aérobiques :**



**: Mécanisme global actif uniquement dans les cellules animales où X peut varier jusqu'à 36 ATP produites par équivalent de glucose suivant l'état de la mitochondrie.*

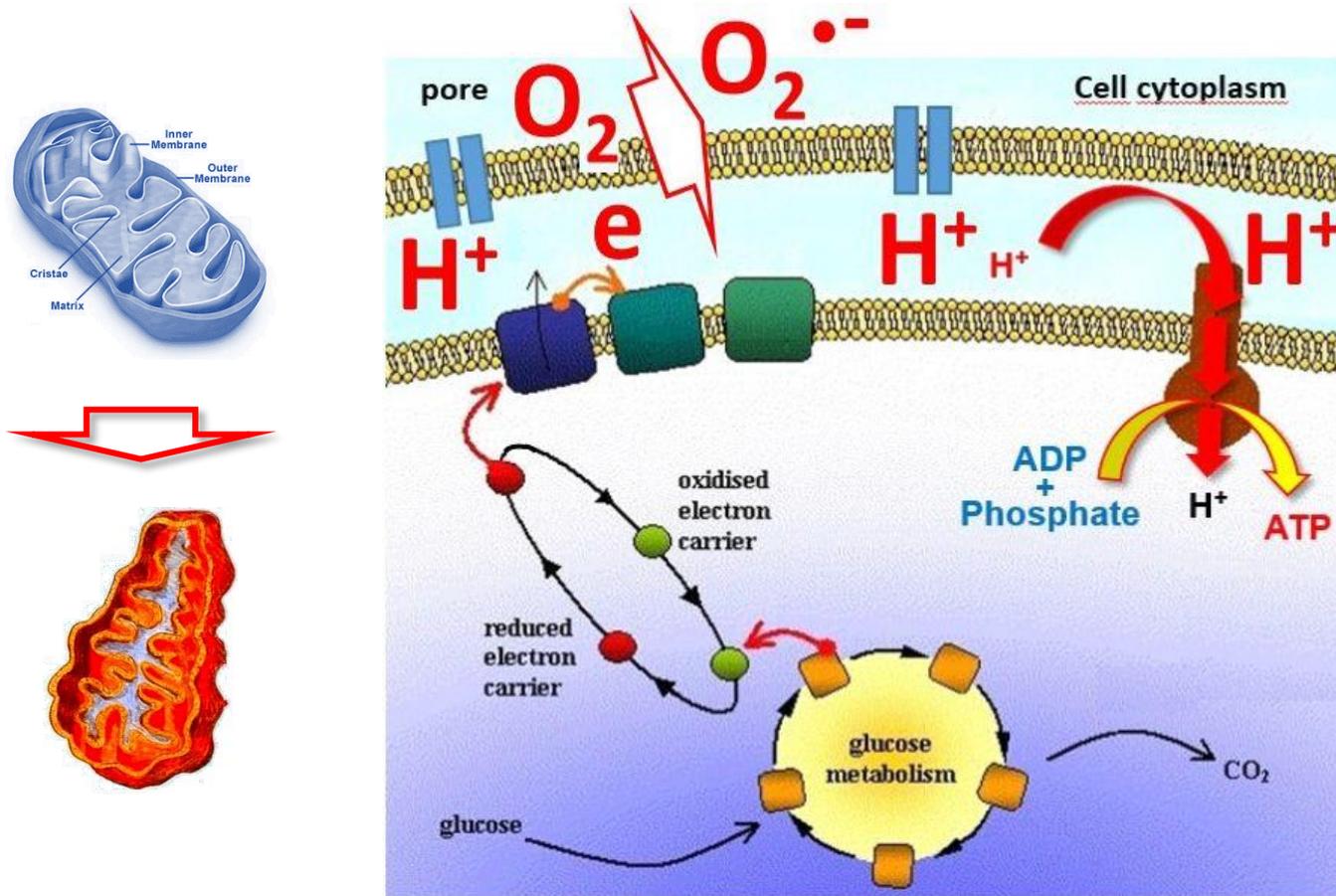
□ Stress Oxydant et Energie : *La Mitochondrie*

- *Mitochondrie fonctionnelle au sein d'une cellule normale*



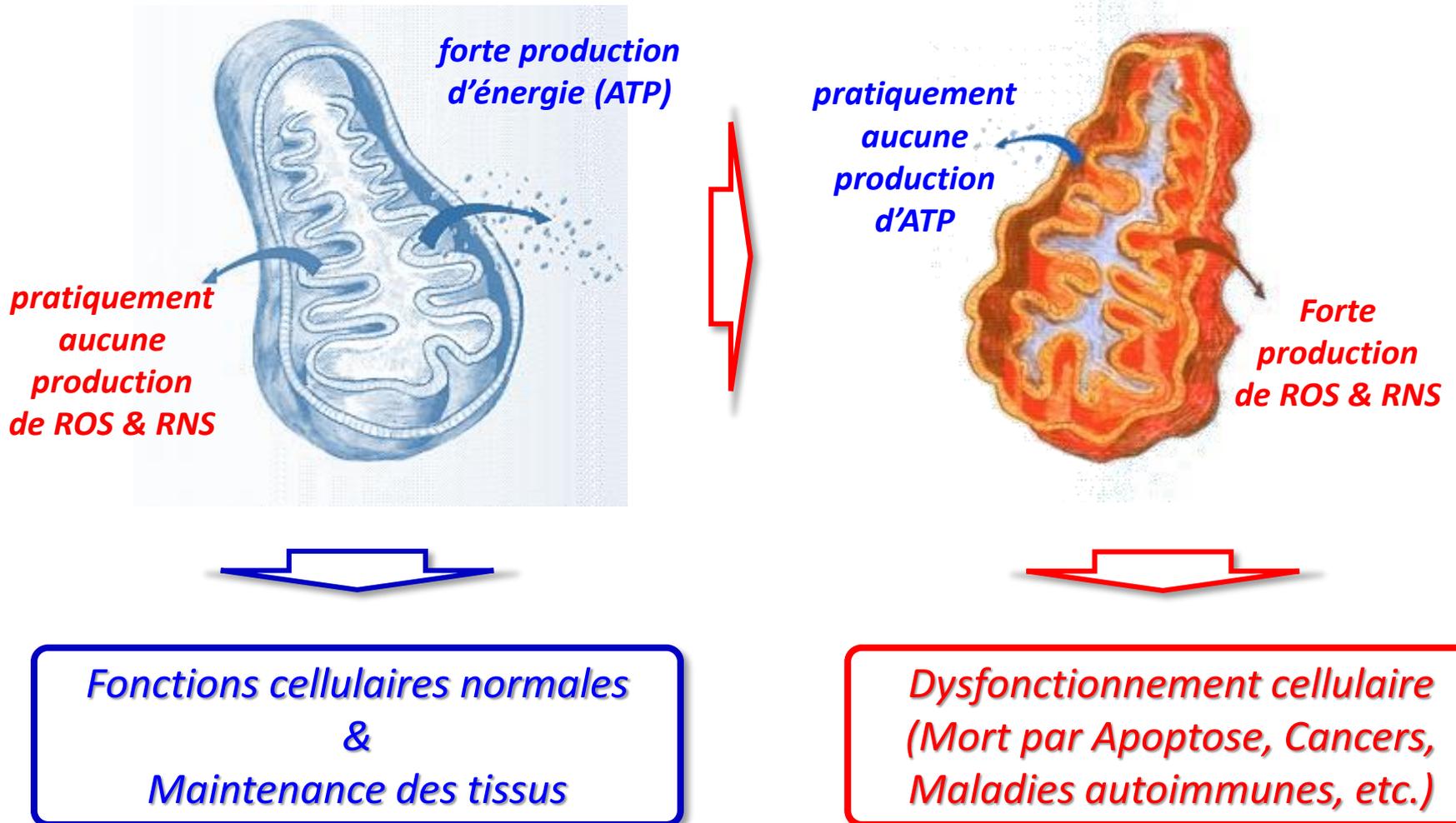
□ Stress Oxydant et Energie : *La Mitochondrie*

- *Mitochondrie surchargée ou non fonctionnelle*

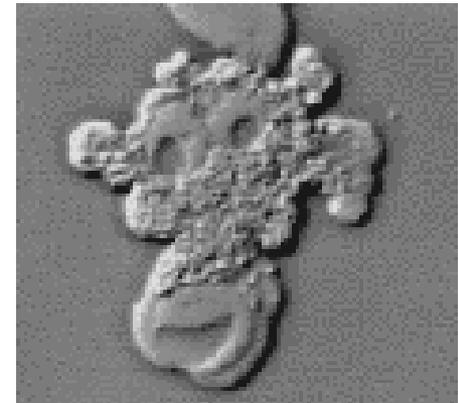
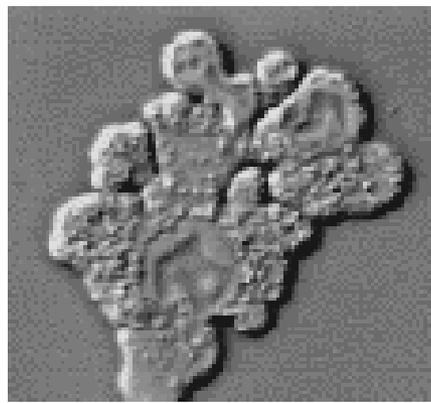
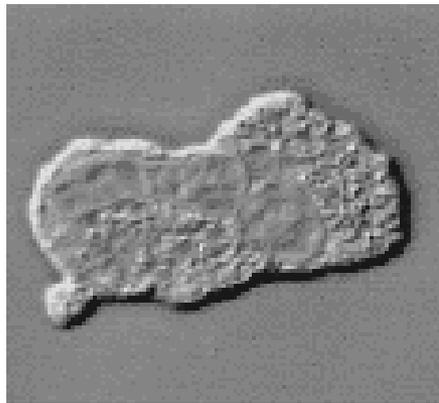
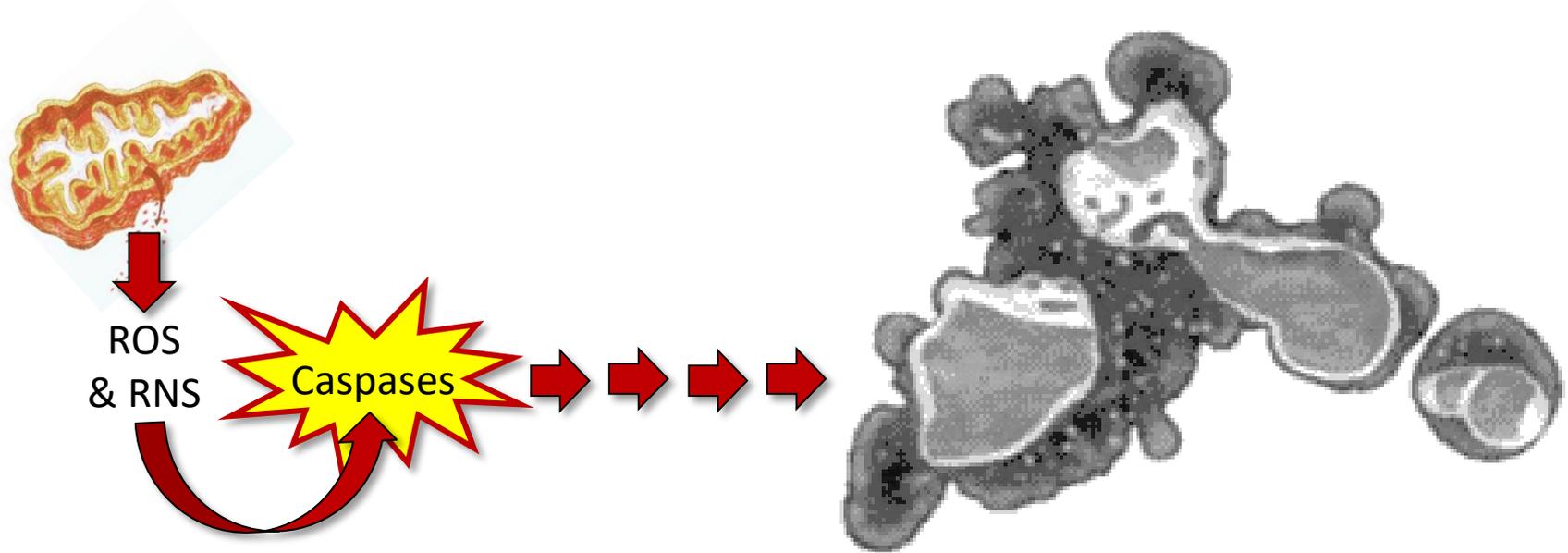


☐ Stress Oxydant et Energie : *La Mitochondrie*

- *Mitochondrie normale vs. Mitochondrie non fonctionnelle*



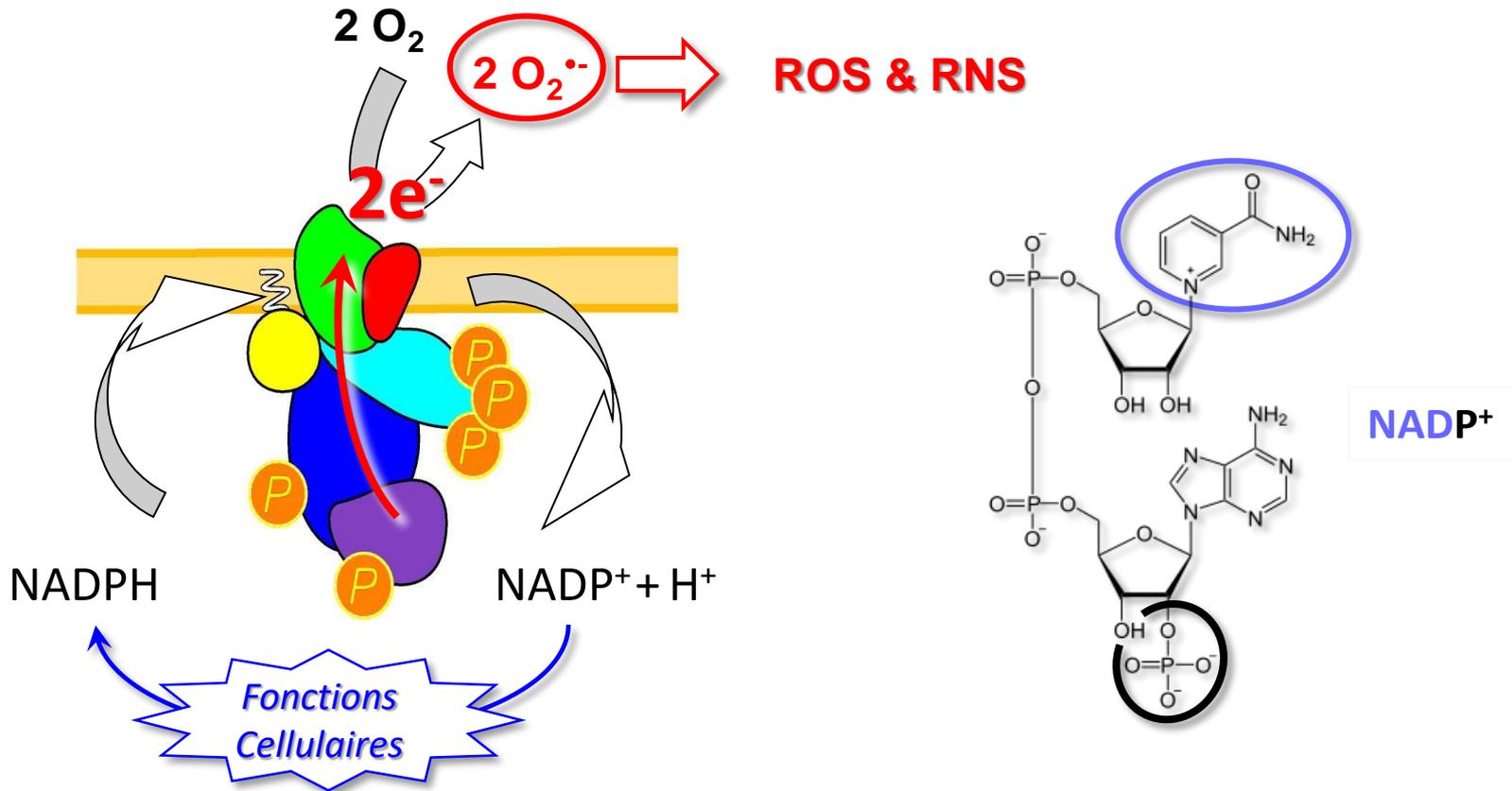
□ Apoptose et Stress Oxydant induit par les Mitochondries



Lymphocyte humain évoluant par apoptose. Photos adaptées de : www.cellsalive.com

□ Néanmoins le Stress Oxydant est aussi Intrinsèque car Nécessaire

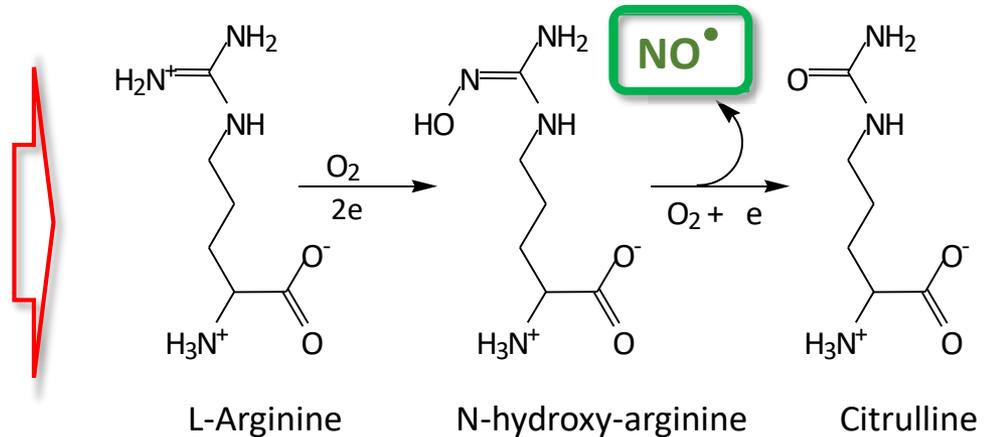
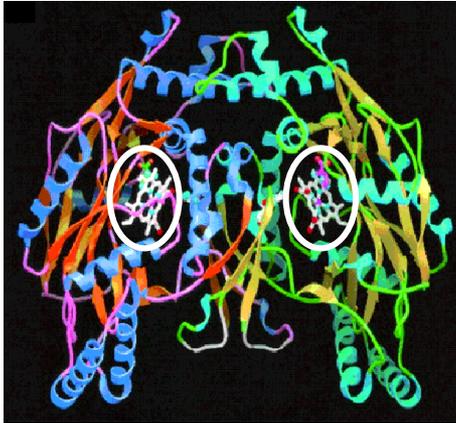
o Recyclage de NAD(P)^+ , les 2 autres Vecteurs énergétiques intracellulaires :



NAD(P)^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate);
P : ions Phosphates (PO_4^{2-})

□ Une seconde Source Nécessaire & Intrinsèque du Stress Oxydant : NO[•]

o NO Synthases :



o Deux Grands Rôles Positifs et un Rôle Equivoque de NO :

✓ Protection :



- o Microbicide,
- o Neurotransmetteur,
- o Antioxydant (réagit avec les radicaux),
- o Phagocytose (système immunitaire),
- o Protection anti NFκ, etc..

✓ Regulation :

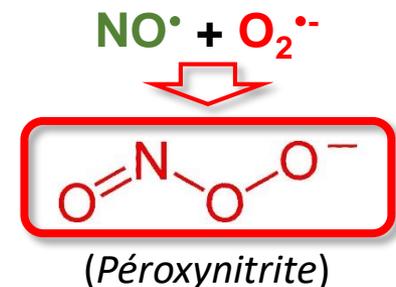


- o Tonus vasculaire,
- o Vasodilatation (trinitrine),
- o Mécanotransduction,
- o Perméabilité Vasculaire,
- o Adhésion Cellulaire, etc..

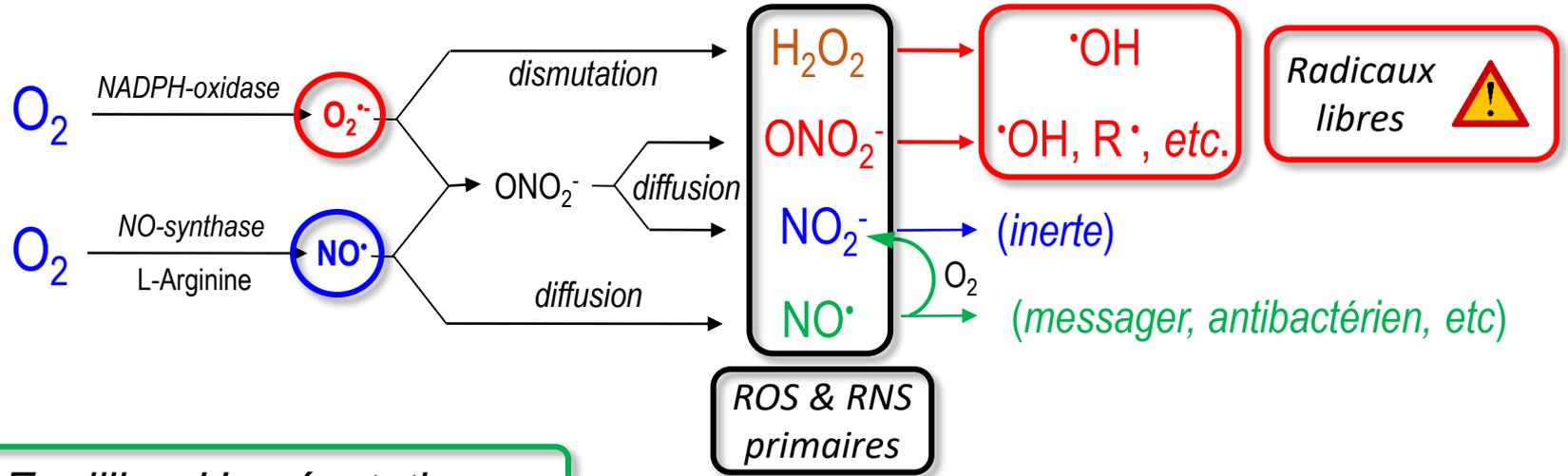
✓ Janus



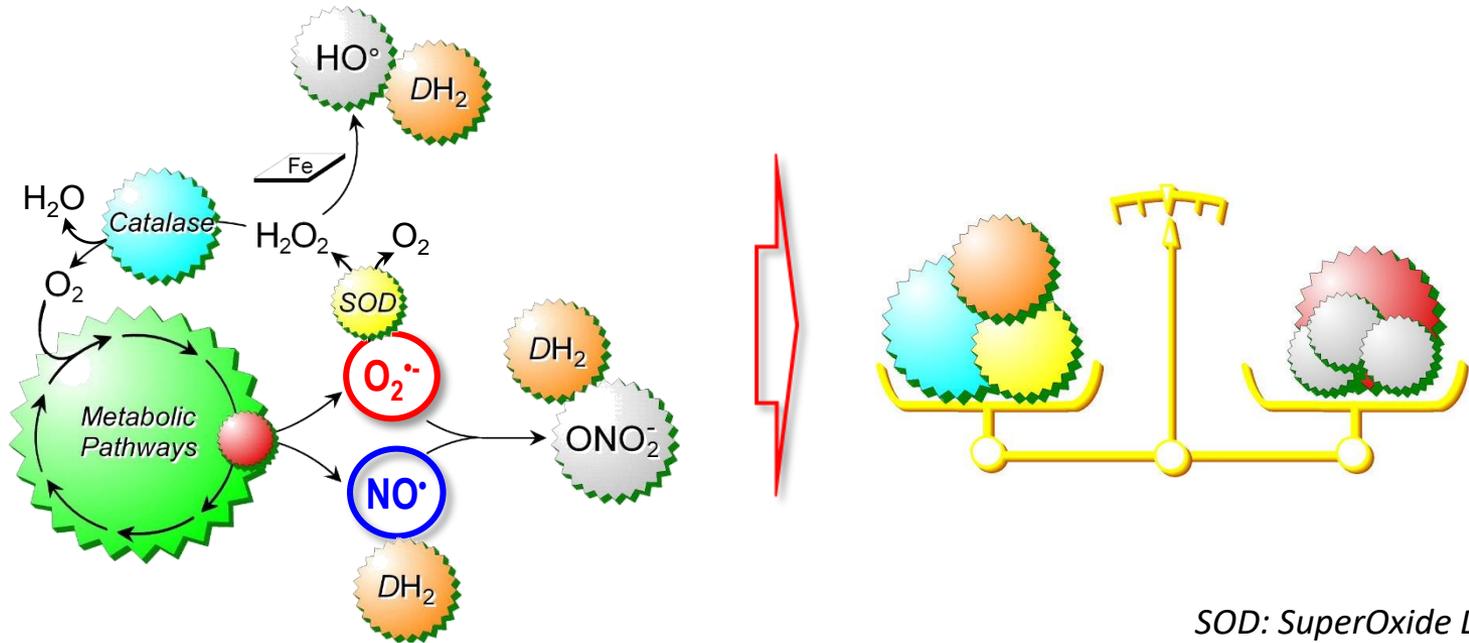
- o par ex., ischémie,
- o Réaction avec O₂^{•-} :



Stress Oxydant Intrinsèque et Balance Homéostatique



Equilibre Homéostatique :



SOD: SuperOxide Dismutase
 DH₂ (Anti-oxidants): glutathion, tocophérol, phenols, tanins, vitamin C, etc.

□ Un Exemple Typique de Rupture de l'Équilibre Homéostatique

○ Les « Enfants-Lune » (*Xeroderma Pigmentosum*)

- ✓ Rare trait autosomique récessif héréditaire impliquant une photosensibilité anormale,
- ✓ Très forte probabilité de développer des néoplasmes sur les zones cutanées exposées à la lumière (environ 2000 fois plus que pour une population normale).

○ Origine / Causes

- ✓ Faible activité de la catalase (enzyme catalysant la dismutation de H_2O_2 en eau et oxygène),
- ✓ Très faible capacité de réparation de l'ADN.

○ Symptômes & Complications

- ✓ Apparition de cloques ou de taches de rousseur de faibles expositions au soleil,
- ✓ Vieillesse prématurée de la peau, des lèvres, des yeux, de la bouche et de la langue,
- ✓ Augmentation significative de l'incidence de cancers dans ces mêmes zones,
- ✓ Cécité résultant de lésions oculaires ou de cancers près des yeux,
- ✓ Complications neurologiques progressives, troubles du développement et retard mental.





Espèces Activées de l'Oxygène et de l'Azote, Radicaux Libres et Stress Oxydant : du Meilleur (protection de l'organisme)... au Pire (inflammations, maladies auto-immunes et cancers)

II. Nanoélectrodes Platinées pour la Détection Directe des ROS & RNS Primaires Intracellulaires ou Intra-Organelles

❖ Collaboration avec Michael Mirkin

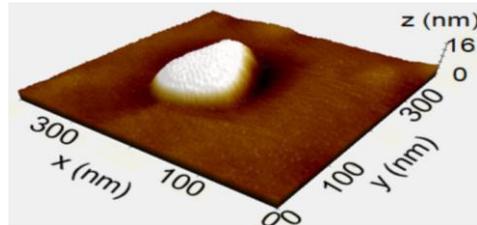
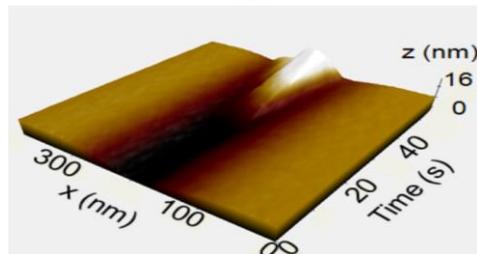
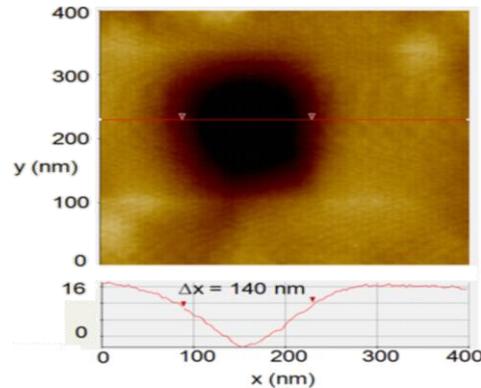


❖ Collaboration with Weihua Huang

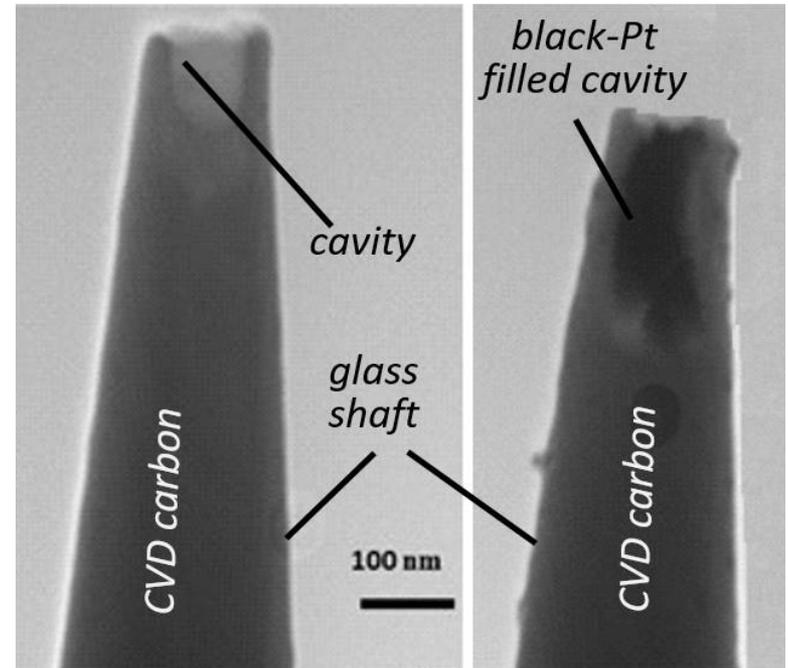


□ Nanoélectrodes à Cavité Platinée pour la Détection Intracellulaire

✓ Première génération (\varnothing ca. 300 nm)



✓ Seconde génération (\varnothing ca. 100 nm)



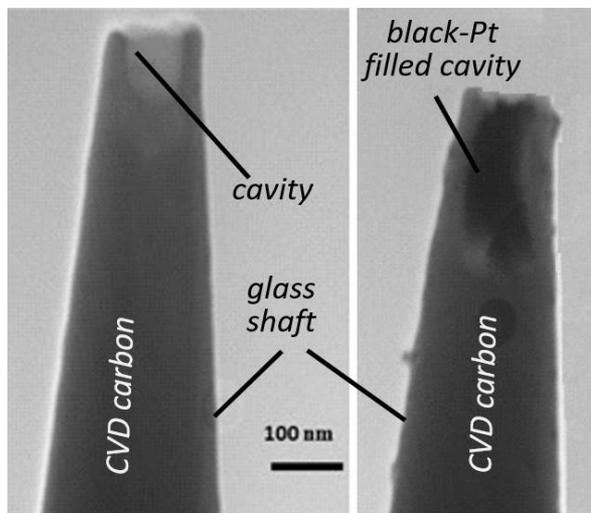
Y. Wang, J.-M. Noël, J. Velmurugan, W. Nogala, M. V. Mirkin, C. Lu, M. Guille Collignon, F. Lemaître, C. Amatore.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, **2012**, 11534-11539.

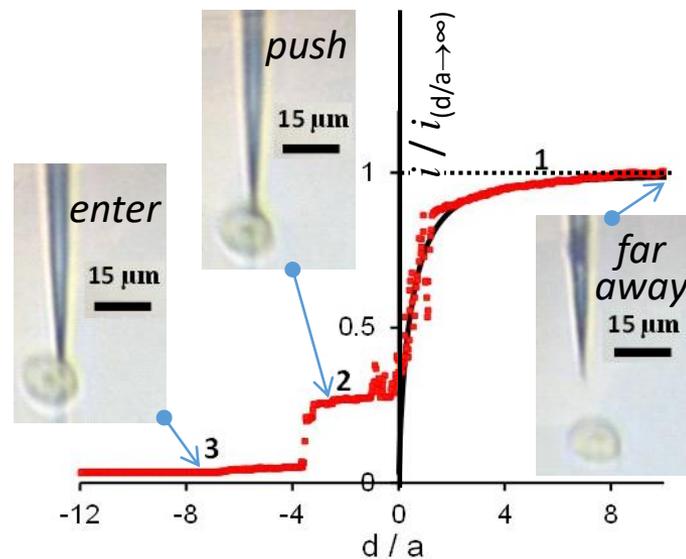
Y. Li, K. Hu, Y. Yu, S.A. Rotenberg, C. Amatore, M.V. Mirkin. *J. Am. Chem. Soc.* 139, **2017**, 13055-13062.

□ Nanoélectrodes à Cavité Platinée pour la Détection Intracellulaire

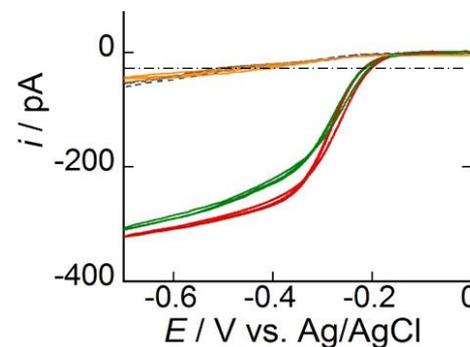
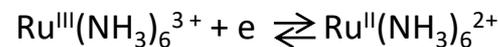
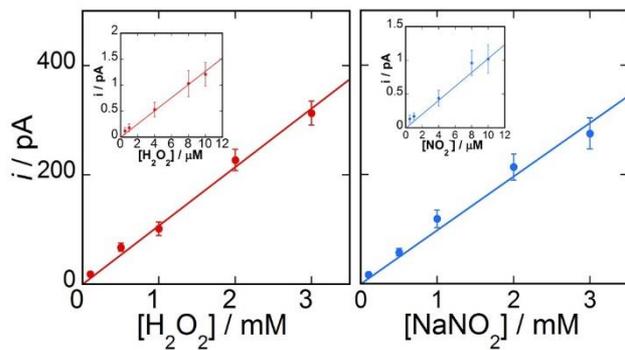
✓ Préparation des nanoélectrodes



✓ Pénétration dans une cellule humaine saine



✓ Calibration & stabilité

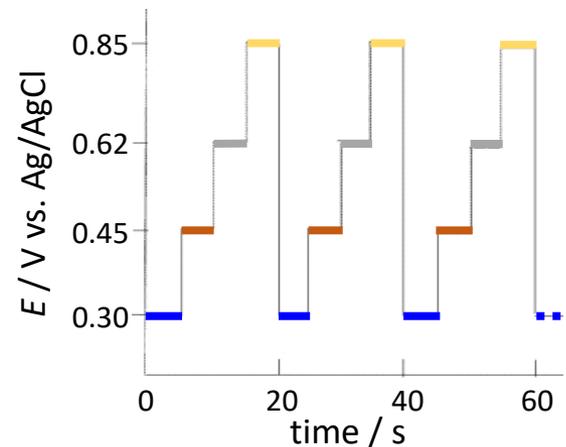
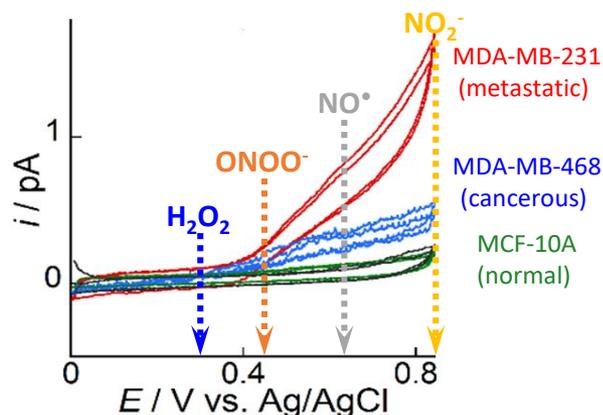


Application : Détection intracellulaire de ROS / RNS et Cancer du Sein

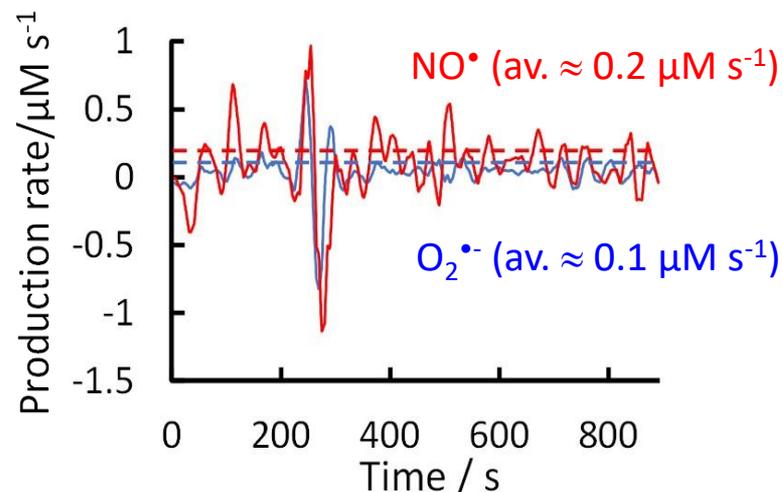
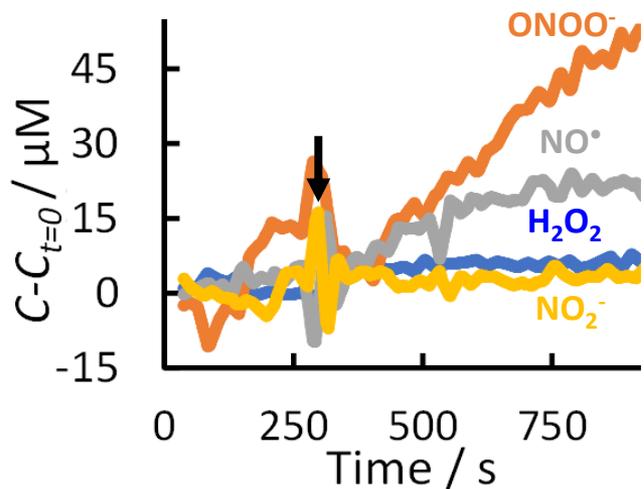
✓ Détection Intracellulaire des ROS & RNS



MDA-MB-231 cell (metastatic)

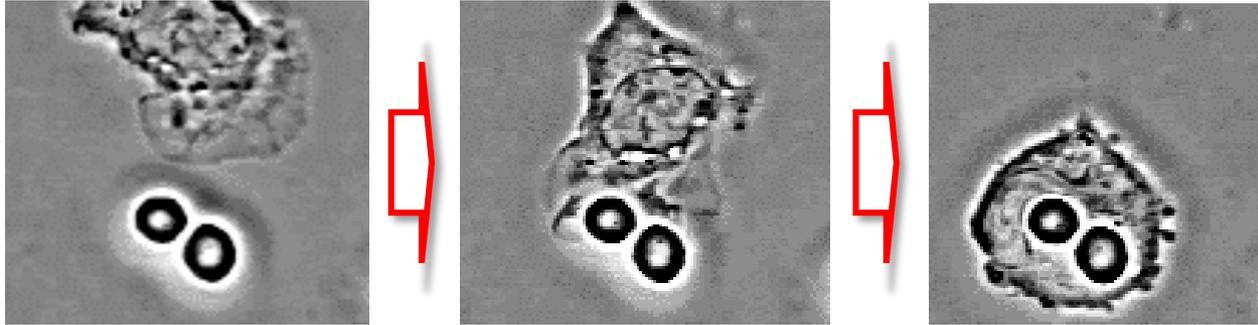


✓ Production Intracellulaire de ROS & RNS par une Cellule Cancéreuse du Sein (MBA-MB-468)



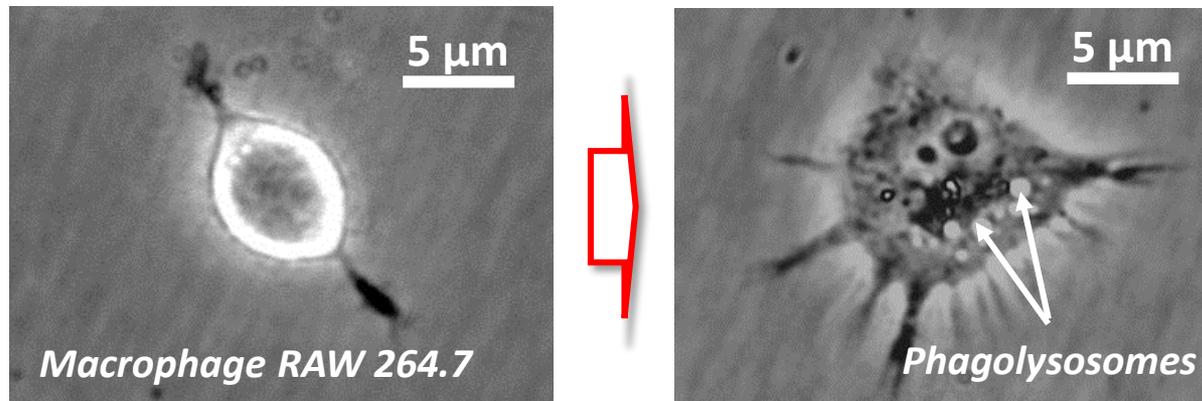
□ Macrophages: Rupture sur Commande de l'Homéostasie ?

- *Phagocytose : Activation des NO-Synthases & NADPH-Oxydases et Génération de ROS/RNS au sein des Phagolysosomes*



Photographies adaptées à partir de www.cellsalive.com. © James A. Sullivan

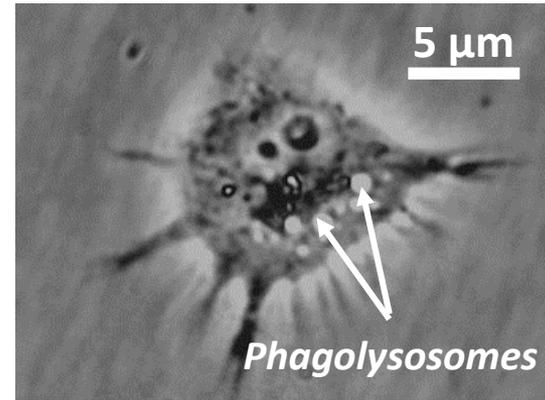
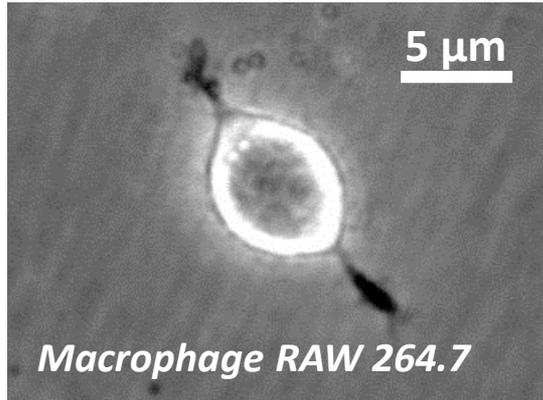
- *Phagocytose : Activation d'un macrophage murin (RAW 264.7) par IFN- γ / LPS **



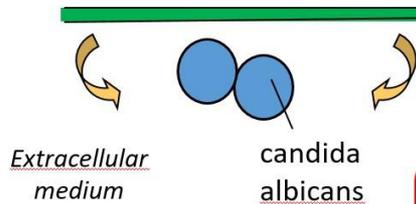
* Des macrophages stimulés par des cytokines, comme l'interféron- γ (IFN- γ), 1 ou des composants microbiens, comme le lipopolysaccharide (LPS), simulent une réponse non spécifique aux pathogènes.

Macrophages: Rupture sur Commande de l'Homéostasie ?

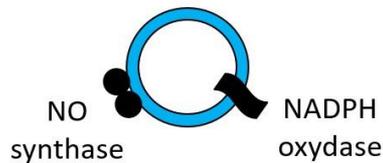
- *Phagocytose : Activation des NO-Synthases & NADPH-Oxydases et Génération de ROS/RNS au sein des Phagolysosomes*



- ✓ *Capture par Endocytose (Phagosomes)*

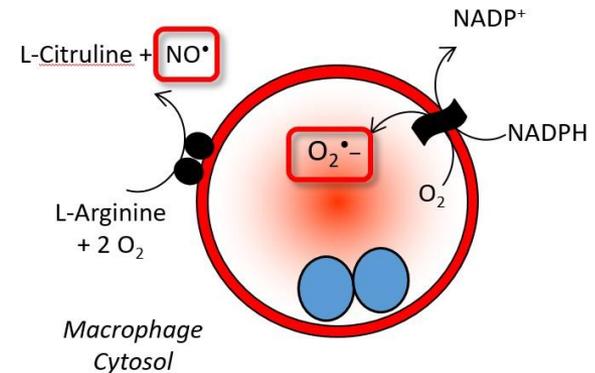


- ✓ *Activation des Lysosomes (Ca^{2+})*



Fusion

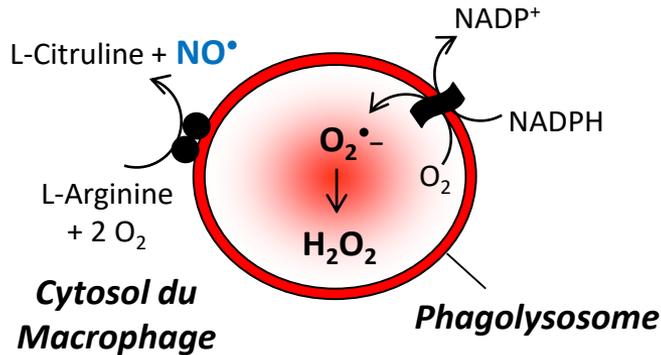
- ✓ *Constitution et Activation des Phagolysosomes (selon la littérature classique)*



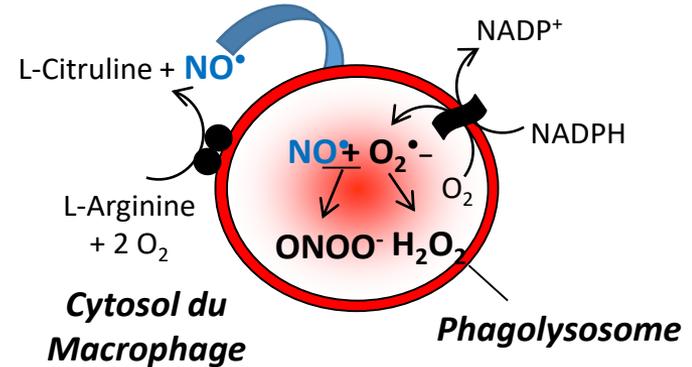
Macrophages : Détection des ROS/RNS au Sein des Phagolysosomes ?

- Production des 4 ROS/RNS Primaires au sein de Phagolysosomes

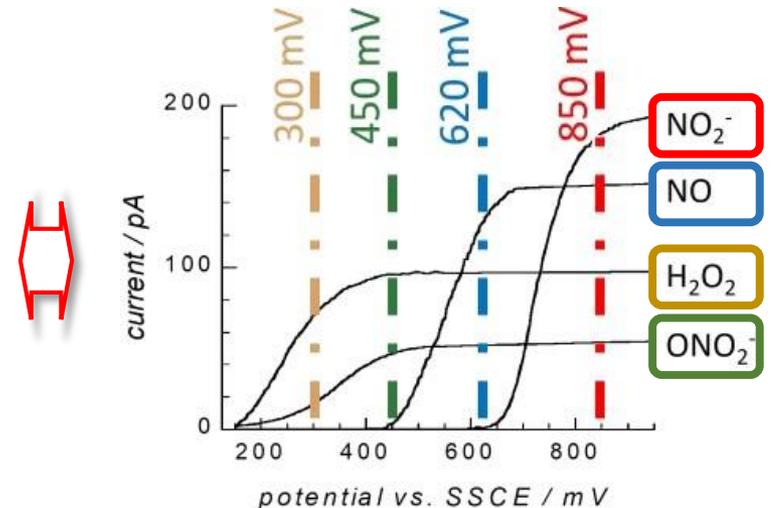
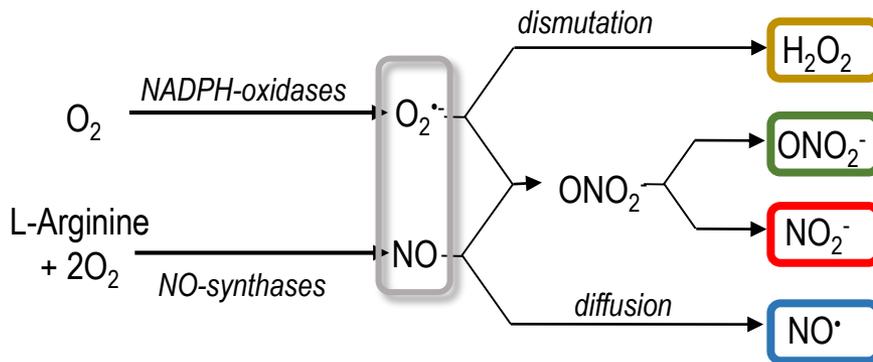
➤ Littérature classique :



➤ Ou ? (C. Amatore et al, 2006) :

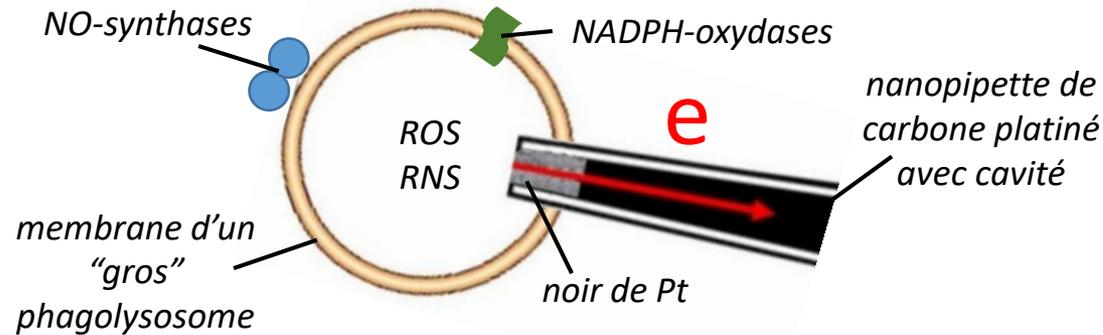


- En fait, la question peut être tranchée car les 4 ROS/RNS Primaires présents au sein d'un phagolysosome activé sont Caractérisables Electrochimiquement avec nos Nanoélectrodes

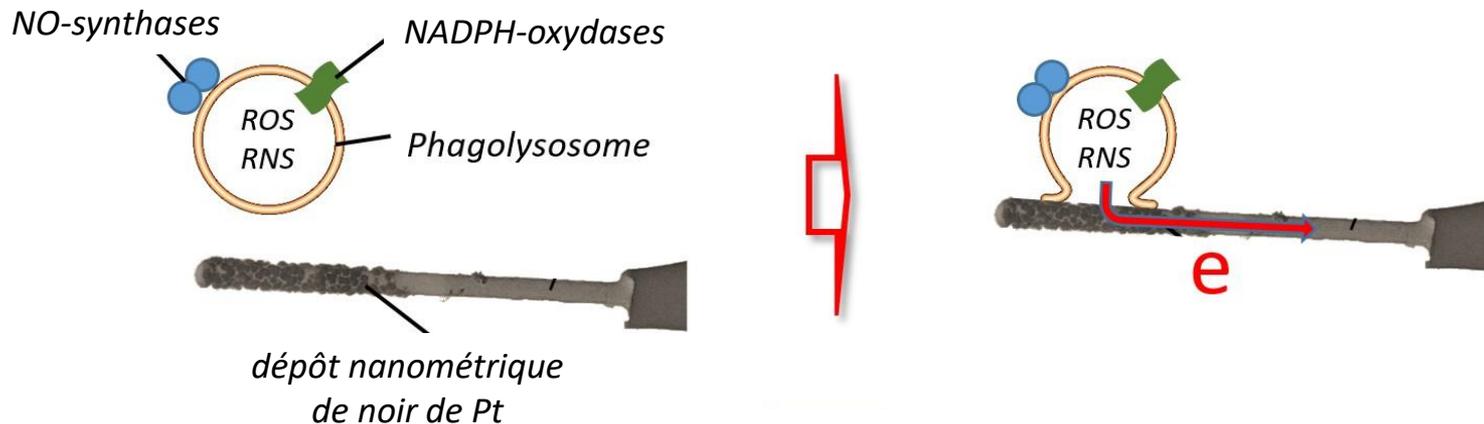


□ Deux Solutions pour l'Analyse du Contenu d'Organelles Intracellulaires

- *Avec Maintien à long terme des Mécanismes Homéostatiques : Nanoélectrode à Cavité (nanoélectrode traversant la membrane de l'organelle tout en maintenant son étanchéité)*



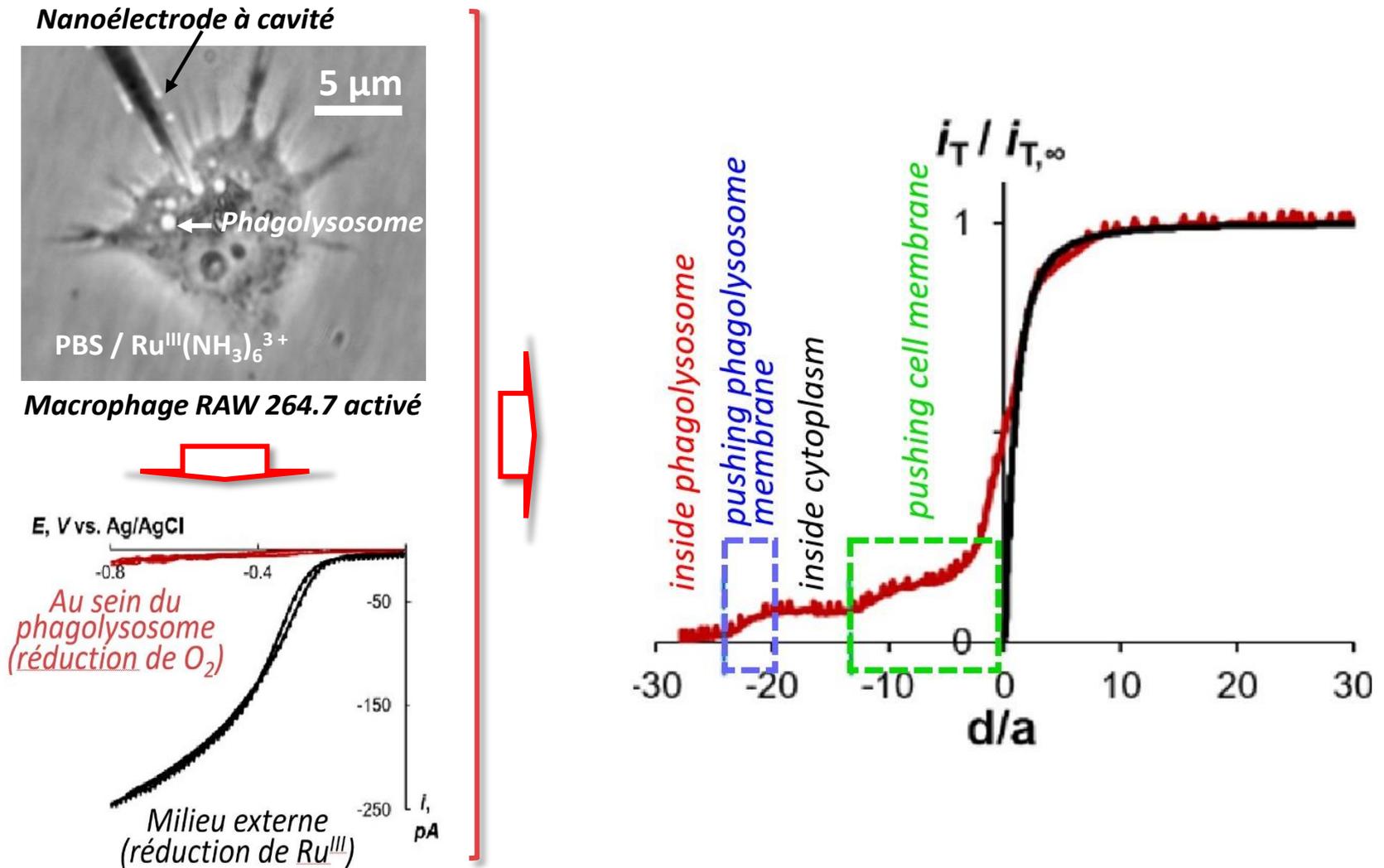
- *Avec Rupture Spontanée de la Membrane sur la Nanoélectrode (IVIEC)* (a priori uniquement mesure du contenu présent avant la rupture de la membrane)*



*: IVIEC = Intracellular Vesicle Impact ElectroChemistry

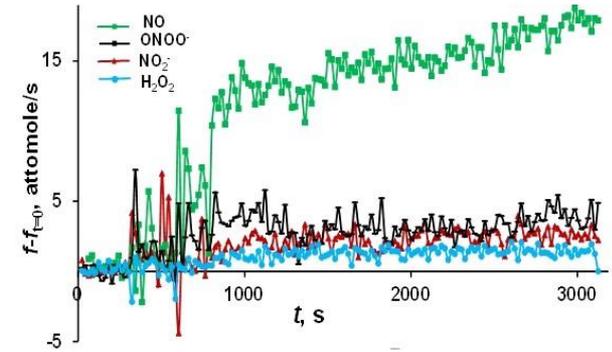
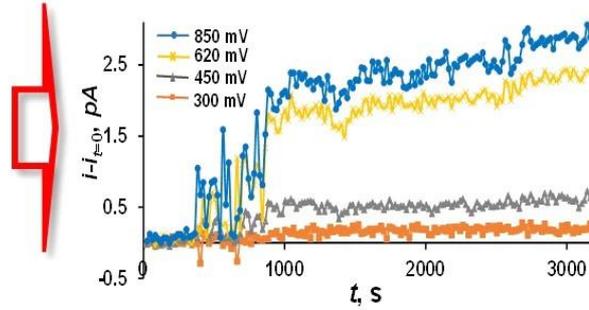
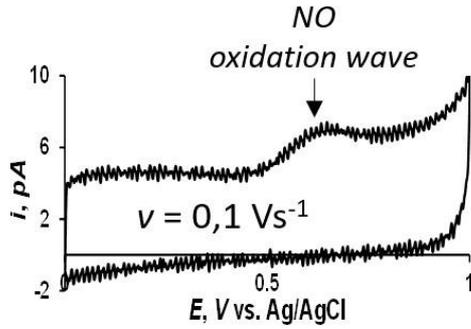
□ Détection avec Nanoélectrode à Cavité (« gros » Phagolysosomes)

- Pénétration dans un RAW 264.7 Activé puis dans l'un de ses Phagolysosomes

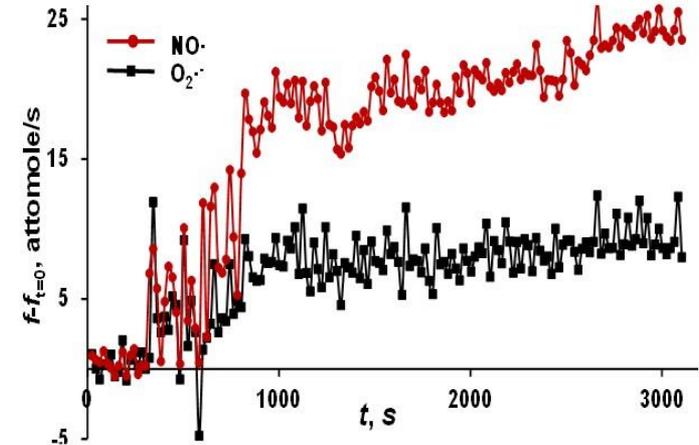
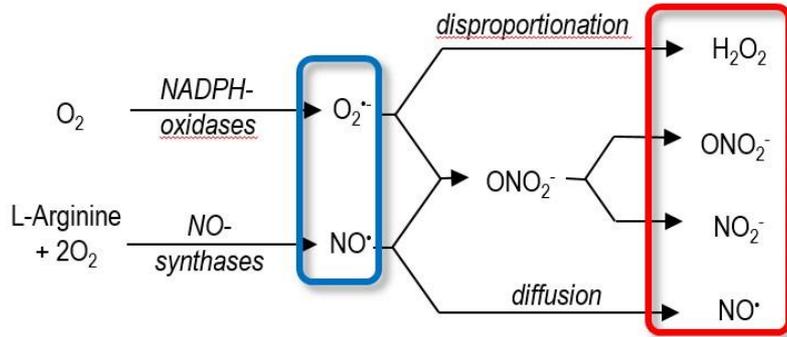


□ Contrôle Homéostatique en ROS/RNS dans les Phagolysosomes

- Mesures cinétiques individuelles des 4 ROS/RNS primaires

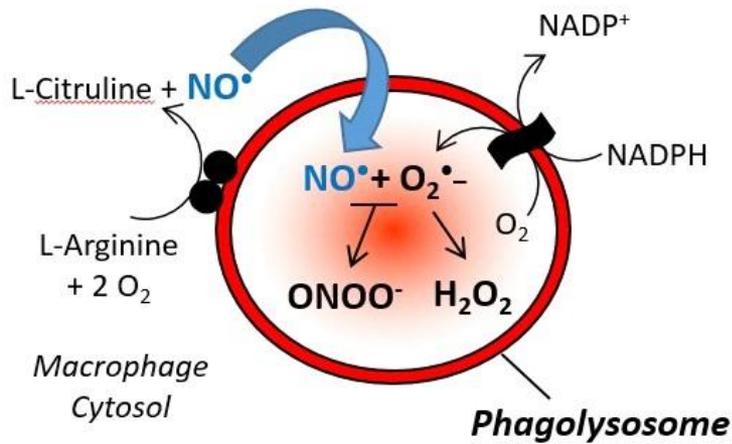


- Reconstruction des flux de production de NO et O₂^{•-}

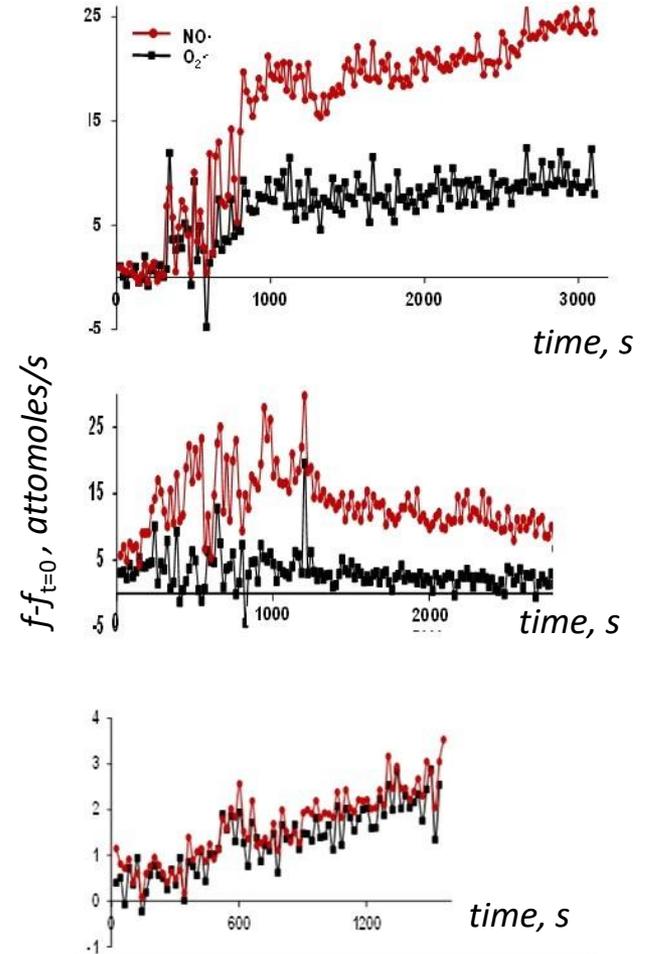


□ Variabilité de la Réponse Homéostatique d'un Phagolysosome à l'autre

○ Un mécanisme unique...

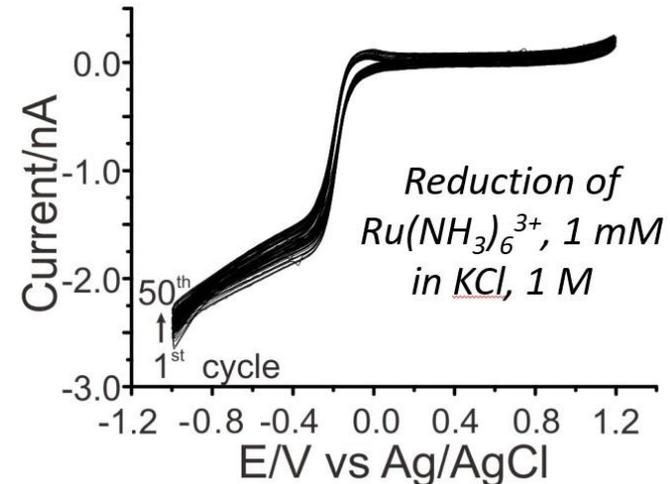
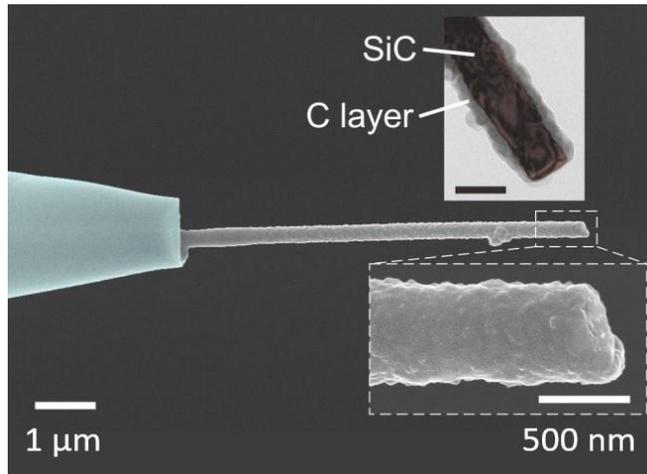
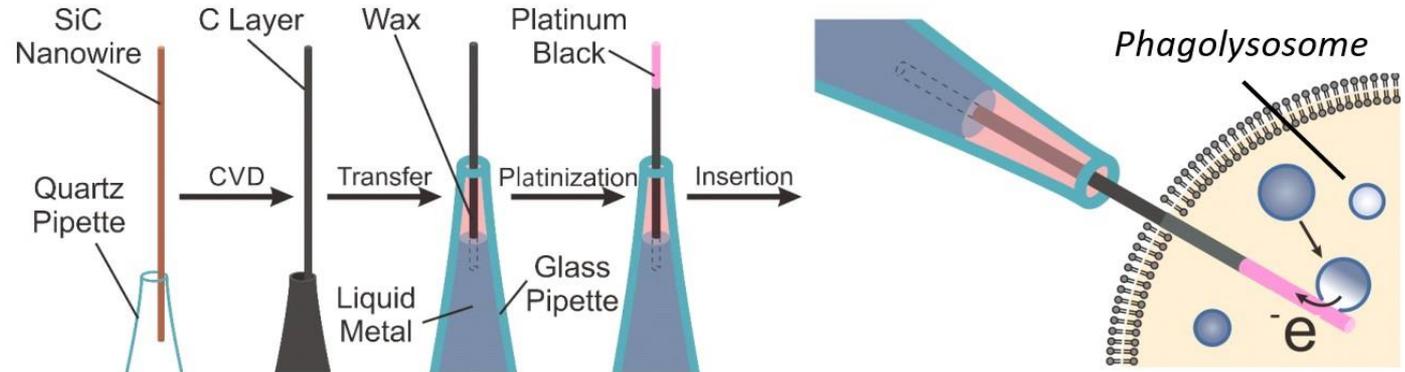


○ Mais des réponses très contrastées...



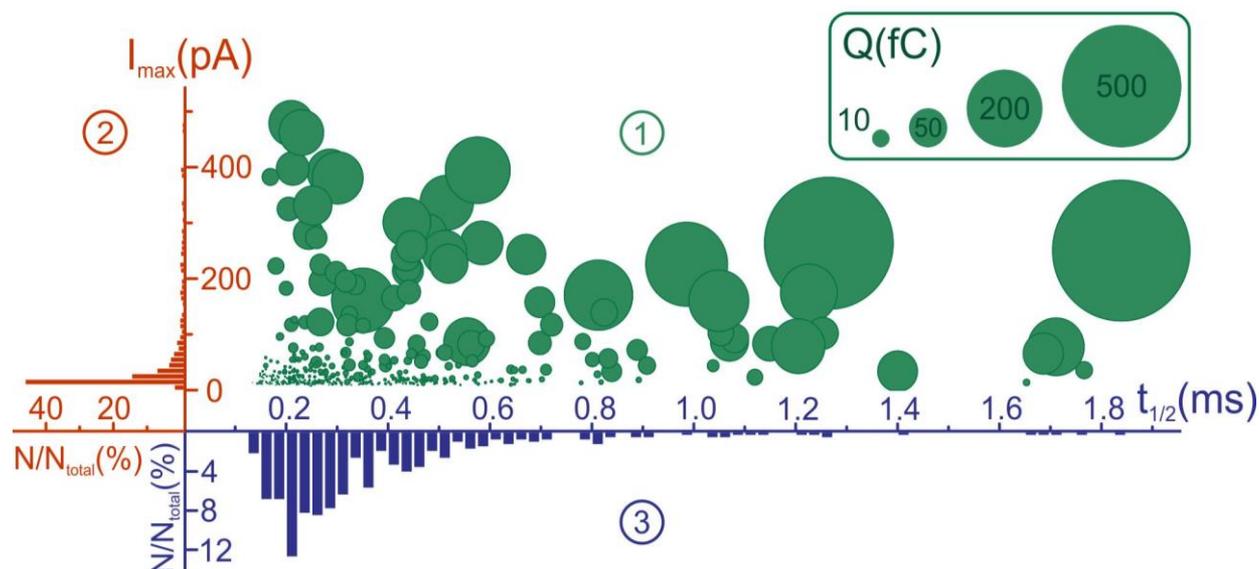
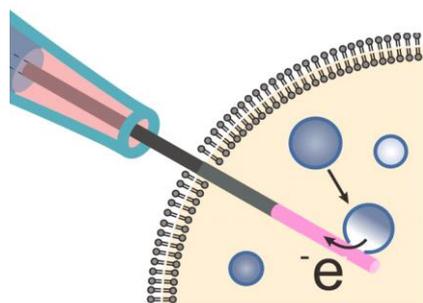
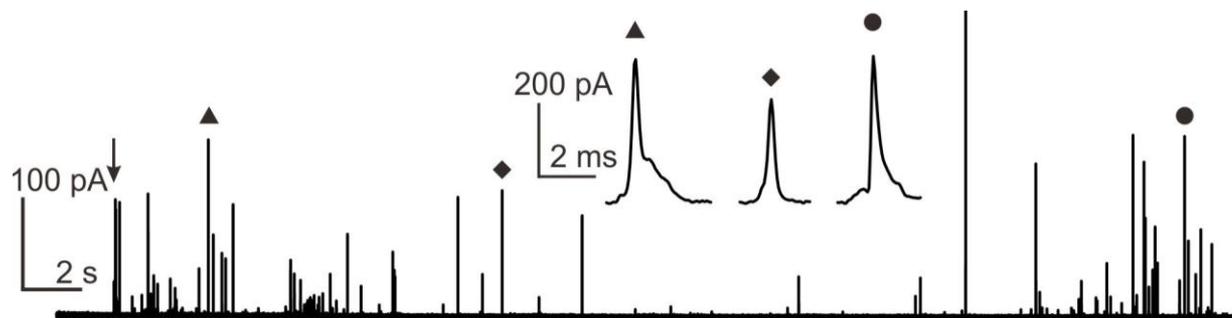
□ Détections Statistiques par IVIEC sur Nanoélectrodes SiC@C@Pt-black

- Fabrication et qualification d'une nanoélectrode SiC@C@Pt-black



□ Détections Statistiques par IVIEC sur Nanoélectrodes SiC@C@Pt-black

- Trace ampérométrique représentant une série d'événements IVIEC successifs

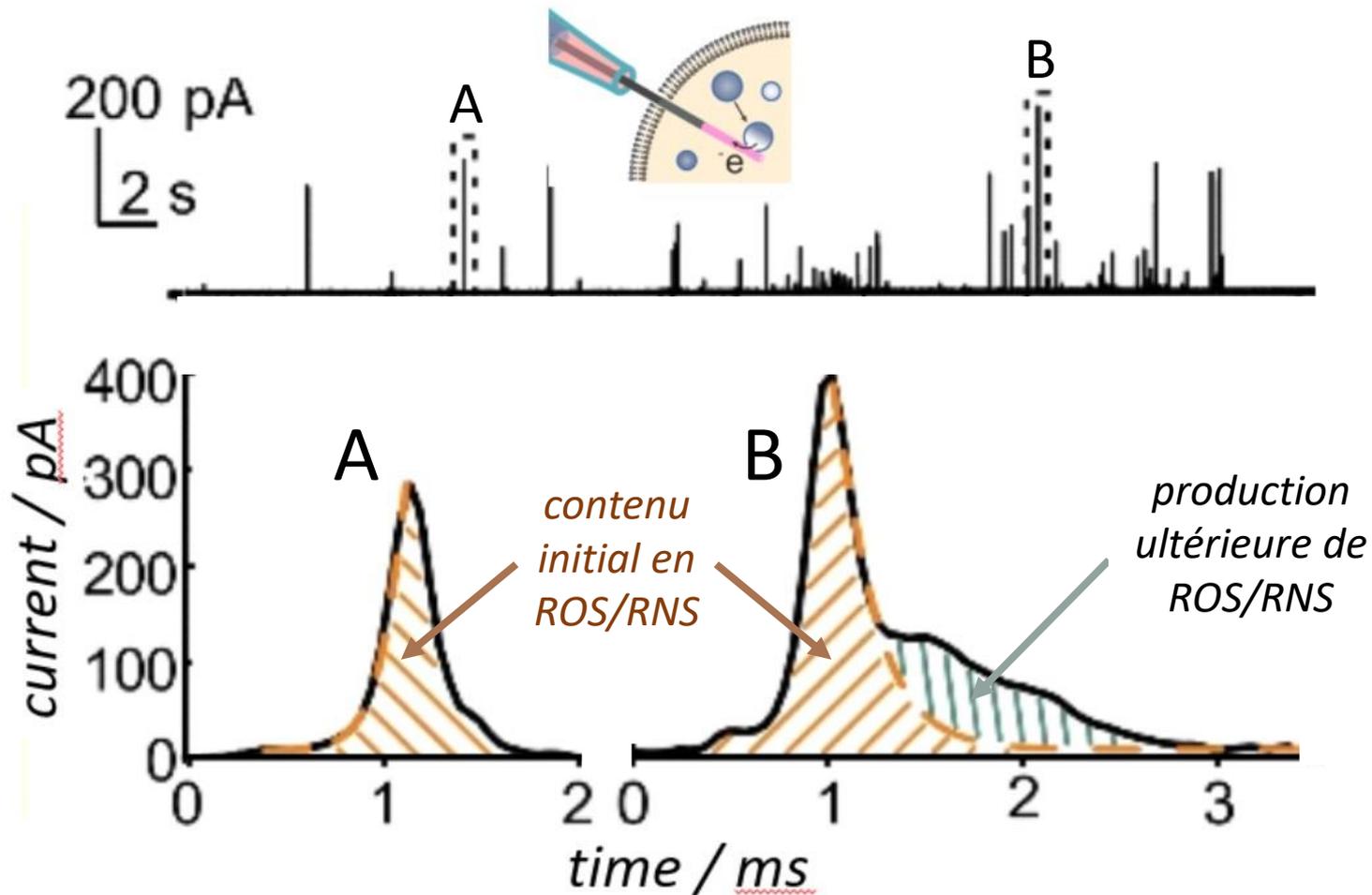


X.W. Zhang, Q.F. Qiu, H. Jiang, F.L. Zhang, Y.L. Liu, C. Amatore, W.H. Huang. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, **2017**, 12997-13000.

J. Lovrić, N. Najafinobar, J. Dunevall, S. Majdi, I. Svir, A. Oleinick, C. Amatore, A.G. Ewing. *Faraday Discuss.*, **193**, **2016**, 65-79.

□ Détections Statistiques par IVIEC sur Nanoélectrodes SiC@C@Pt-black

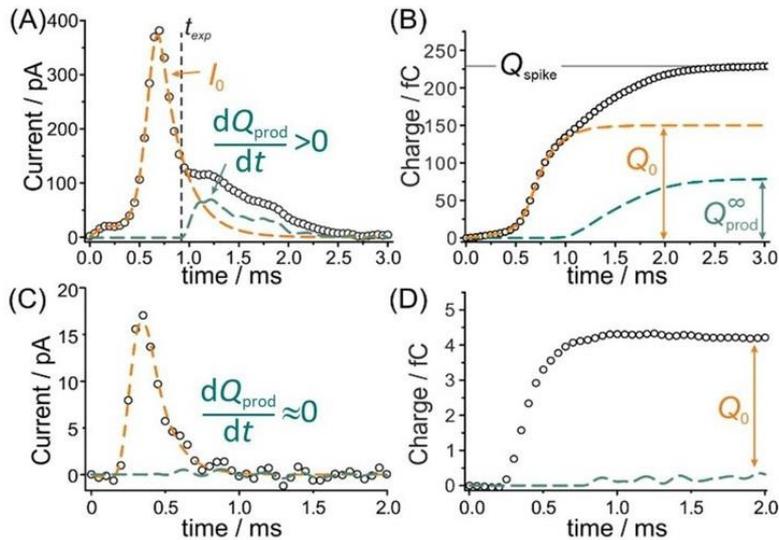
- Mise en évidence d'un processus de contrôle homéostatique actif aux temps courts



□ Homéostasie en ROS/RNS aux Temps Courts

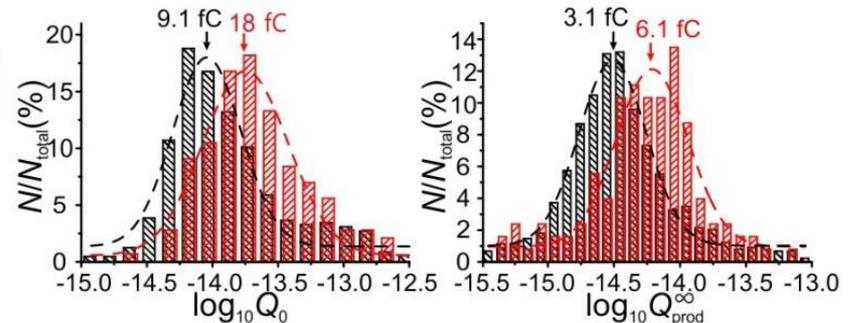
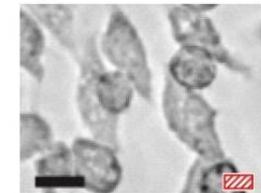
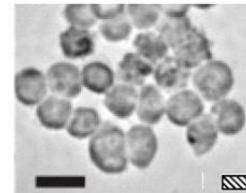
- Déconvolution entre Quantités Initiales et Produites après l'IVIEC

$$\underbrace{\frac{dQ_{in}(t)}{dt}}_{\substack{\text{global} \\ \text{ROS/RNS}}} = \underbrace{-k_{q(t)}^{diff} Q_{in}(t)}_{\substack{\text{vesicle} \\ \text{emptying}}} + \underbrace{\frac{dQ_{prod}(t)}{dt}}_{\substack{\text{homeostatic} \\ \text{production}}}$$



Sleeping state

IFN- γ /LPS activated



A. Oleinick, I. Svir, C. Amatore. *Proc. Royal Soc. A*, 473, **2017**, 20160684 (12 p).

X.W. Zhang, A. Oleinick, H. Jiang, Q.L. Liao, Q.F. Qiu, I. Svir, Y.L. Liu, C. Amatore, W.H. Huang. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, **2019**, 7753-7756.



Espèces Activées de l'Oxygène et de l'Azote, Radicaux Libres et Stress Oxydant : du Meilleur (protection de l'organisme)... au Pire (inflammations, maladies auto-immunes et cancers)

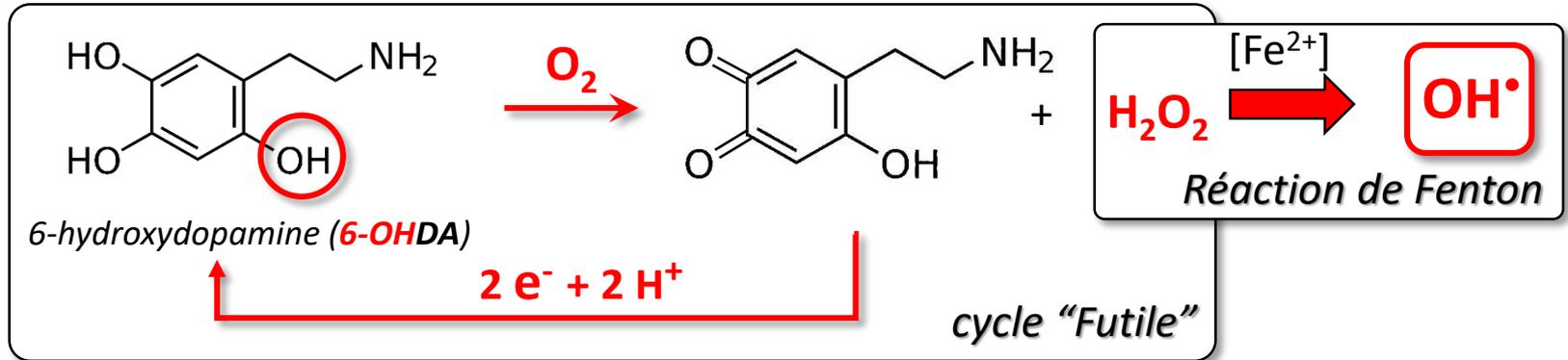
III. Etude à l'Echelle de la Synapse de l'Effet d'un Stress Oxydant Chronique : Modèle de la Maladie de Parkinson (6-Hydroxy-Dopamine)

Collaboration avec Weihua Huang (LIA CNRS "NanoBioCatEchem")

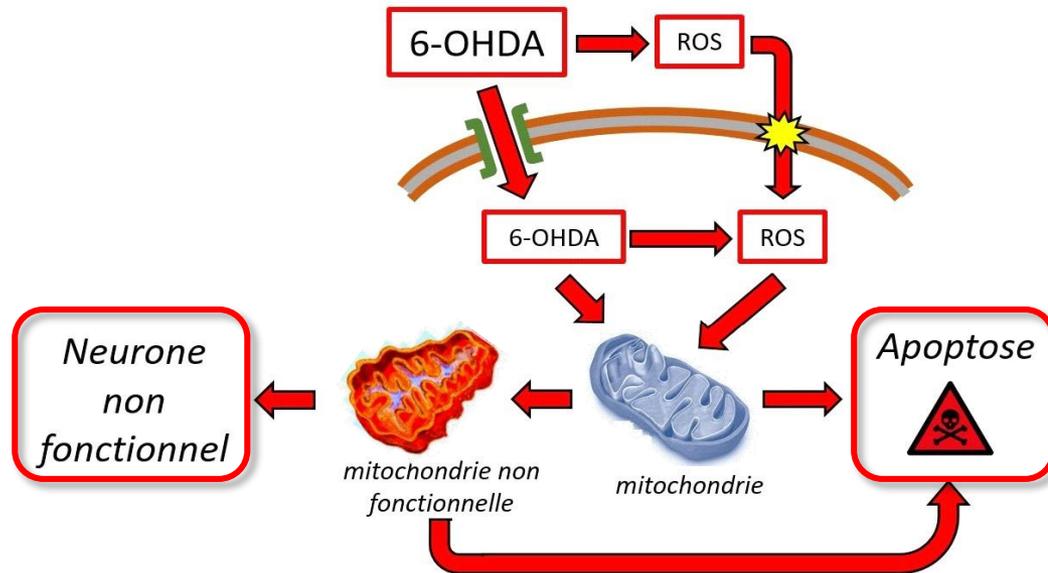


❑ Dégénérescence Parkinsonienne : Modèle de la 6-Hydroxy-Dopamine

- La 6-OHDA engendre des radicaux hydroxyles au sein des neurones dopaminergiques

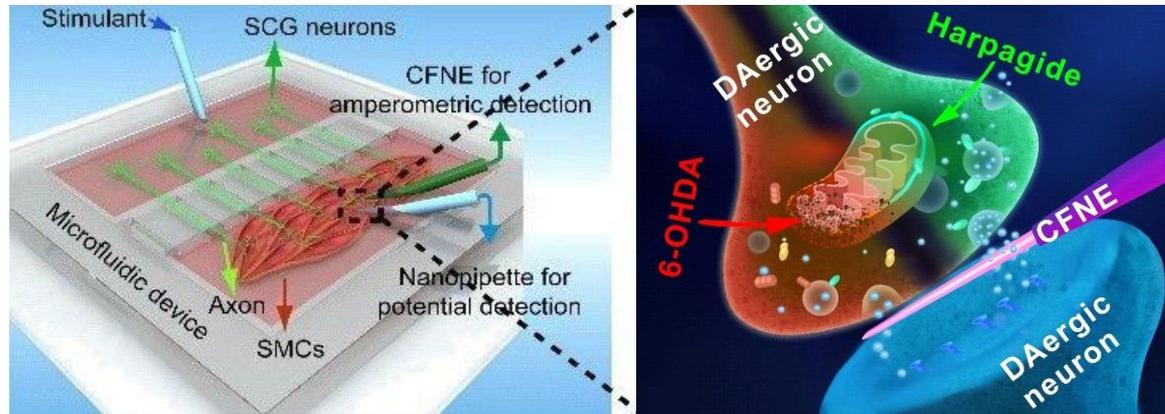


- Dégénérescence neuronale du type Parkinson des neurones dopaminergiques

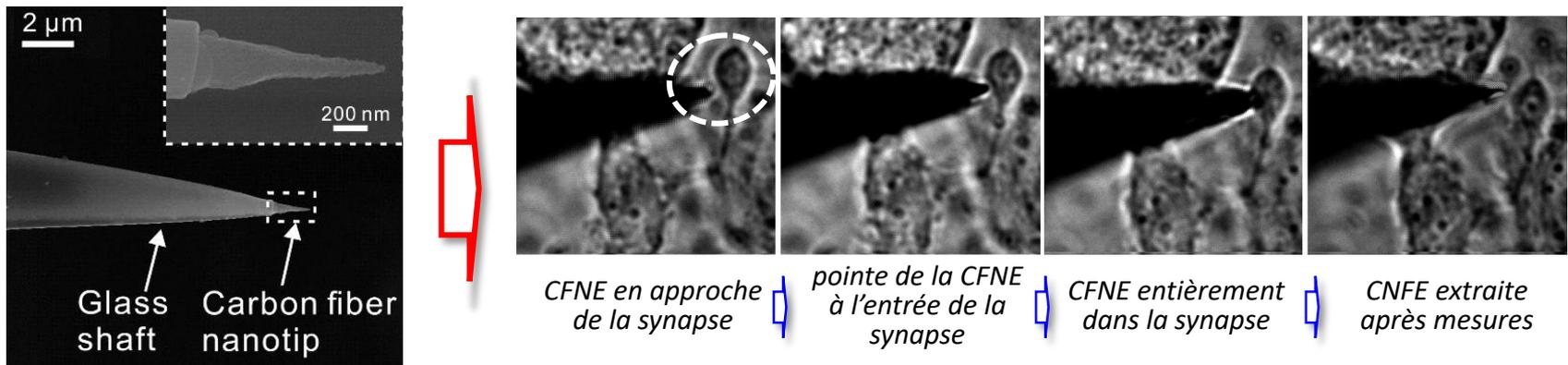


□ Dégénérescence Parkinsonienne : Modèle de la 6-Hydroxy-Dopamine

- *Principe de la mesure de l'effet de la 6-OHDA sur la communication intrasynaptique*



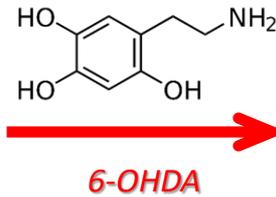
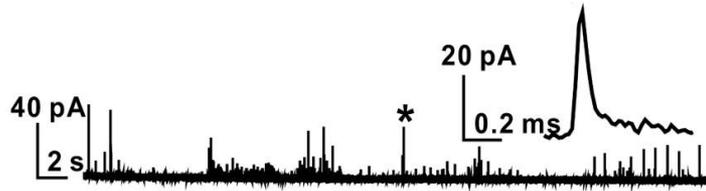
- *Nanoélectrode de carbone pour la détection intrasynaptique de neurotransmetteurs*



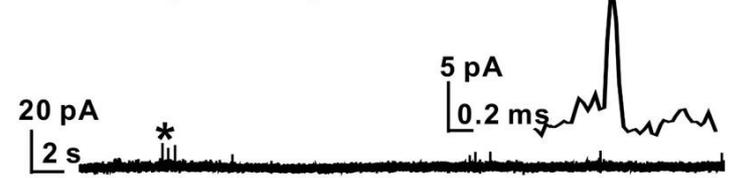
□ Dégénérescence Parkinsonienne : Modèle de la 6-Hydroxy-Dopamine

○ Etude à l'échelle de la synapse : Protection par un antioxydant naturel

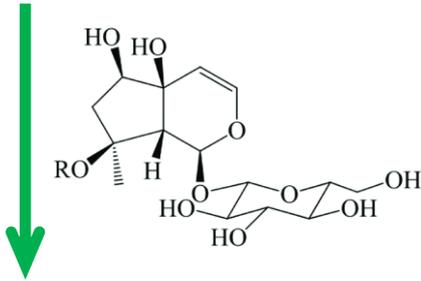
□ Controls: Untreated DAergic Neurons



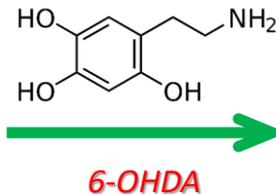
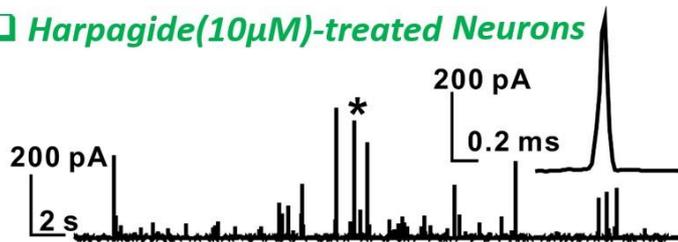
□ 6-OHDA(100 mM)-treated Neurons



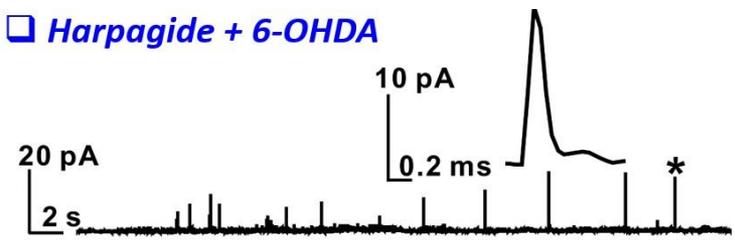
Harpagide



□ Harpagide(10 μM)-treated Neurons

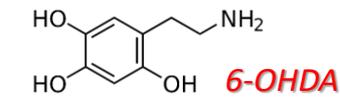


□ Harpagide + 6-OHDA

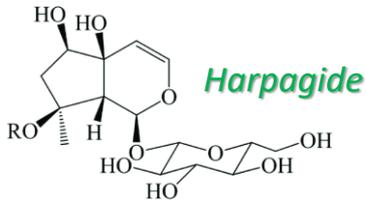


□ Dégénérescence Parkinsonienne : Modèle de la 6-Hydroxy-Dopamine

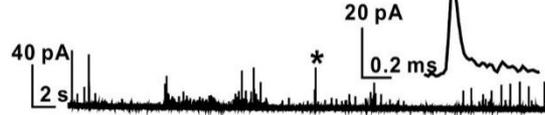
○ Etude à l'échelle de la synapse : Protection par un antioxydant naturel



vs.



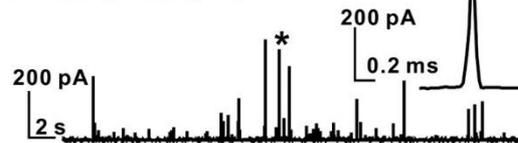
□ Controls: Untreated DAergic Neurons



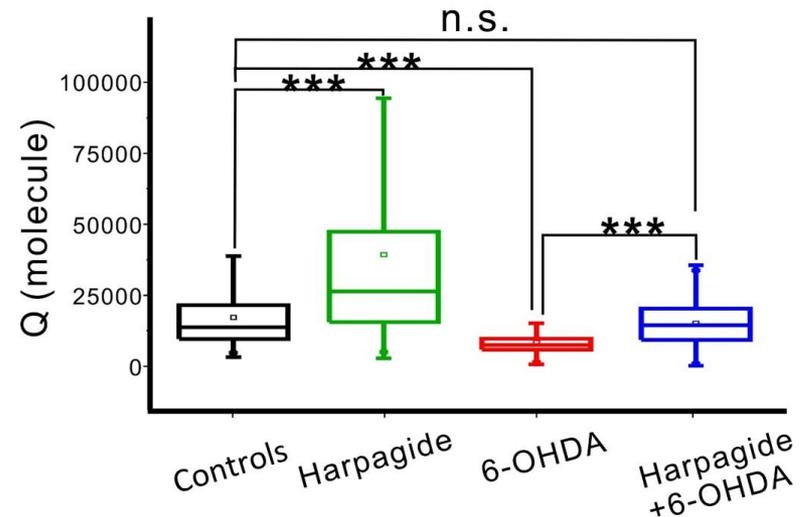
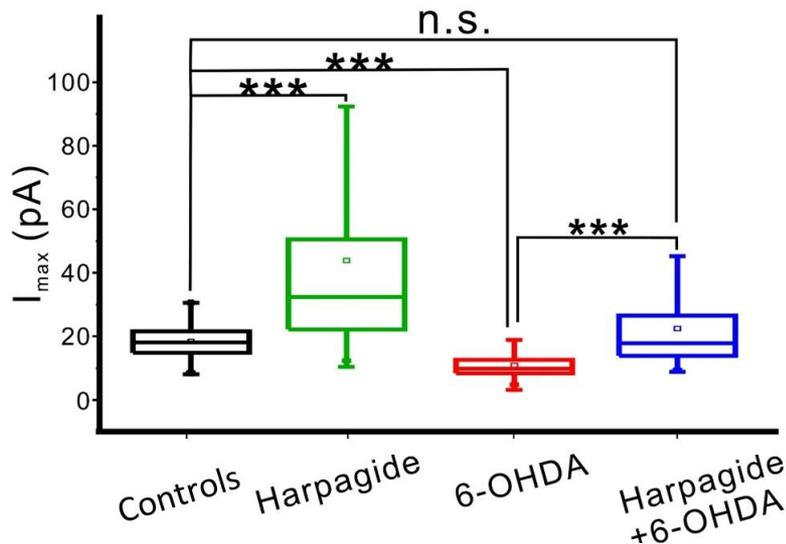
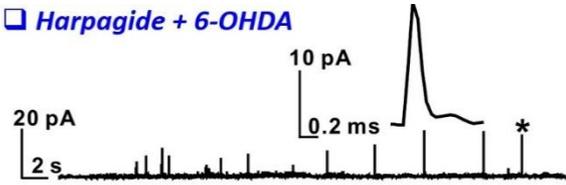
□ 6-OHDA(100 mM)-treated Neurons



□ Harpagide(10µM)-treated Neurons



□ Harpagide + 6-OHDA





Remerciements

☐ UMR 8640 "PASTEUR", ENS Paris:

- ❖ Prof Irina SVIR
- ❖ Dr Alexander OLEINICK

☐ Queens College, New York:

- ❖ Prof Michael MIRKIN
- ❖ Dr Yun LI
- ❖ Dr Keke HU

☐ Xiamen University (China):

- ❖ Prof Zhongqun TIAN
- ❖ Dr Ren HU

☐ Wuhan University (China):

- ❖ Prof Weihua HUANG
- ❖ Dr Yanling LIU
- ❖ Dr Xin-Wei ZHANG
- ❖ M Hong JIANG
- ❖ M Quan-Lan LIAO
- ❖ M Quan-Fa QIU
- ❖ Mrs Yun TANG
- ❖ Mrs Xiao-Ke YANG
- ❖ M Wen-Tao WU
- ❖ Mrs Fu-Li ZHANG



□ Stress Oxydant : Méthodes Classiques de Détection / Caractérisation

○ Mise en Evidence de la Production des ROS & RNS en milieu Biologique

- ✓ Analyses Spectrophotométriques directes
- ✓ HPLC équipées de détecteurs adéquats (fluorométriques, spectrophotométriques, ou électrochimiques)
- ✓ Colorants fluorescents, Immunoessais
- ✓ Marqueurs of Lipopéroxidation (diènes conjugués, malondialdéhyde (MDA), ...), de protéines hydroperoxydées, de nucléosides modifiés, des concentrations d'antioxydants ou de leur activité (SOD, catalase, GSSG/GSH, vitamines...), etc.

- Toutes ces méthodes sont importantes mais généralement peu sélectives,
- En outre, elles sont indirectes car elles ne sont généralement applicables qu'à la mise en évidence de produits finaux, et sur des extraits cellulaires ou des fluides biologiques.
- Leur application à l'échelle des cellules vivantes uniques est délicate à impossible par construction.

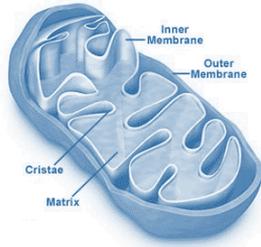
○ Caractérisation des ROS & RNS en milieu Biologique

- ✓ RPE avec Spin traps (nitrones), détection de radicaux
- ✓ Chimiluminescence (oxydation de luminol)
- ✓ Electrodes Spécifiques (NO° , H_2O_2)

- indirecte, sélective, études cinétiques
- indirecte, sélective, quantification
- tissus, cultures cellulaires, extraits cellulaires, fluides biologiques; etc.

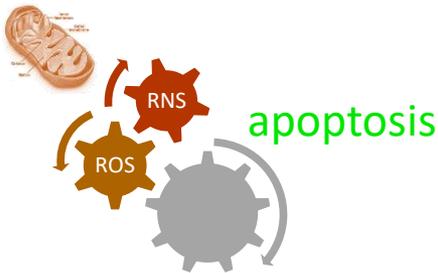
□ So How Comes that Oxidative Stress was Maintained by Evolution?

- Mitochondria communicate with the cell nucleus with ROS/RNS:



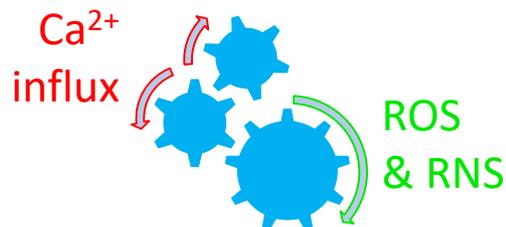
- nucleus genomics generate proteins to replace altered ones,
- nucleus genomics participates in assembling more mitochondria, etc.
- mitochondria initiate apoptotic behaviors

- Apoptosis is essential in cells and tissues maintenance through:



- eliminating defective cells (genetic regulation),
- selecting macrophages or female egg cells based on harmful behavior or poor energetics,
- destroying useless tissues (fetal development, menstruations,), etc.

- Cells sends ROS/RNS signals to the tissue or body by proper enzymatic pools stimulated by Ca^{2+} influxes :



- prepare adjacent cells to respond to incoming stress,
- force blood capillary to deliver more O_2 ,
- change their status, etc.