

Espèces réactives de l'oxygène

Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?

Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Jore

Abstract

Reactive oxygen species. How oxygen may become toxic?

Dysfunctions of oxygen metabolism generate an excess of very reactive chemical species known as « reactive oxygen species » (ROS), among them are free radicals (like $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$), and non-radical products (like H_2O_2 , RO_2H). These species, and particularly the radical species, create oxidative damages on biological macromolecules (DNA, lipids, proteins), which can considerably disturb the cell machinery. Oxidative stress is involved in numerous pathologies (atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases, cancer...) and in the aging process. Antioxidants aimed at more or less inhibiting oxidative damages generated by ROS. In order to better understand the oxyradical-induced reactions, radiolysis is a very efficient method.

Mots-clés Key-words

**Radicaux libres oxygénés, dommages oxydatifs, antioxydants, radiolyse.
Oxygenated free radicals, oxidative damages, antioxydants, radiolysis.**

L'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits que sont le radical superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$ (voir encadré) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) car elles sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. C'est ainsi que dans l'athérosclérose, le rôle des ERO apparaît comme majeur, validant la « théorie oxydative de l'athérosclérose » proposée il y a une quinzaine d'années par Steinberg *et al* [1] et rejoignant la théorie inflammatoire. Les ERO produites par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes-macrophages, sont susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de basse densité (LDL), conduisant à la formation de stries lipidiques, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome (épaississement des artères par un dépôt composé, en partie, d'esters de cholestérol). De même, dans le diabète sucré, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme joue un rôle très important, en particulier dans la survenue des complications diabétiques, qu'elles soient macro- ou micro-vasculaires [2]. Les ERO seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives à début tardif, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être

liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres [3]. La maladie de Parkinson s'accompagne elle aussi d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome [4]. Enfin, les ERO semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer [5].

Glossaire

Constante de vitesse

Constante caractéristique de la vitesse d'une réaction chimique. Par exemple, la réaction d'un radical avec un substrat a une vitesse proportionnelle à la concentration de chaque réactif et à la constante de vitesse k (vitesse = $k \times [\text{radical}] \times [\text{substrat}]$). La constante de vitesse est ici exprimée en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ si chaque concentration est exprimée en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, la vitesse étant exprimée en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Cytosol

Contenu du cytoplasme à l'exclusion des organites membranaires (réticulum endoplasmique et mitochondries).

Dismutation

Réaction d'une espèce moléculaire (ou radicalaire) sur elle-même, générant simultanément une espèce plus oxydée et une espèce plus réduite que la molécule de départ.

Kinase

Enzyme qui transfère une fonction phosphate à une protéine cible.

Mitochondrie

Organite intracellulaire où siège le métabolisme énergétique de la cellule.

Peroxisome

Organite cellulaire bordé d'une seule membrane et équipé d'enzymes effectuant des réactions d'oxydation utilisant l'oxygène moléculaire.

Second messenger

Molécule qui aide à relayer un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule.

Qu'est-ce qu'un radical libre ?

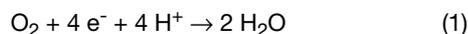
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié).

Radicaux libres centrés sur l'oxygène

- $O_2^{\cdot -}$: radical superoxyde
- HO_2^{\cdot} : radical perhydroxyle
- $\cdot OH$: radical hydroxyle
- RO_2^{\cdot} : radical peroxyde
- RO^{\cdot} : radical alkoxyde

Origine et régulation des espèces réactives de l'oxygène *in vivo*

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale.

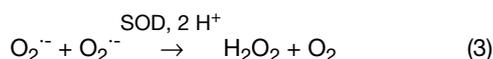


Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) [6].



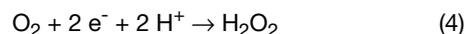
De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales [7], peuvent conduire à la formation de radicaux $O_2^{\cdot -}$. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMN H_2$, $FAD H_2$), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique [8].

Le radical superoxyde qui présente une certaine toxicité (voir le paragraphe sur les effets délétères du stress oxydant) est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction (3)). Il existe deux types de superoxyde dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc ($Cu,Zn-SOD$) et qui est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre contient du manganèse ($Mn-SOD$) et est présente dans les mitochondries.

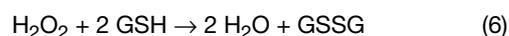


L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée n'est pas elle-même un radical libre mais une molécule (ayant tous ses électrons périphériques appariés). Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène (réaction (4)) en présence d'oxydases (aminoacides oxydases, glycolate oxydase,

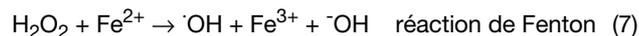
urate oxydase...) qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxyosomes. Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines, avec production simultanée de H_2O_2 .



L'eau oxygénée est un intermédiaire réduit de l'oxygène qui est relativement toxique. Sa concentration est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxyosomes) et les glutathion peroxydases (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (réaction (5)), tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (thiol peptidique, symbolisé ici par GSH) par l'eau oxygénée (réaction (6)).



La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction (7), dite de Fenton) ou Cu^+ [9]. Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques comme nous le verrons par la suite.



Remarque : le radical hydroxyle $\cdot OH$ et l'anion basique $\cdot OH^-$ sont tous deux formés au cours de la réaction (7). Toutefois, ce sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque l'une ($\cdot OH^-$) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre ($\cdot OH$) a un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette différence de structure électronique.

D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 et $\cdot OH$ (figure 1). Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance.

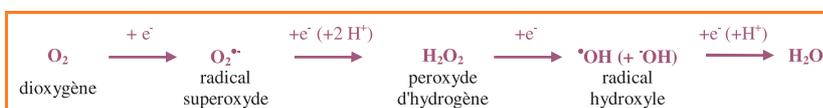


Figure 1 - Intermédiaires réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène.

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense (enzymatiques et non enzymatiques), ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs d'ERO et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydant [8], sans qu'il soit aisé de déterminer si ce dernier est causal ou s'il constitue seulement une réponse de l'organisme à des stimuli, notamment inflammatoires.

Production et analyse des radicaux libres oxygénés par radiolyse de l'eau

La radiolyse de l'eau est un outil précieux pour l'étude physico-chimique des phénomènes radicalaires. En effet, c'est une méthode de production de radicaux libres *in vitro* qui permet d'étudier leur action sur des molécules cibles dissoutes dans l'eau. De plus, la radiolyse de l'eau offre la possibilité d'analyser d'une manière rigoureuse les mécanismes radicalaires complexes résultant de l'action de ces radicaux libres.

La décomposition de l'eau pure par des rayonnements ionisants tels que les rayons gamma (provenant de sources radioactives de ^{137}Cs ou de ^{60}Co) produit en quelques nanosecondes les espèces radicalaires e^-_{aq} (électron hydraté), $\cdot\text{OH}$ et $\text{H}\cdot$, ainsi que les espèces moléculaires H_2 , H_2O_2 et H^+ (figure 2). La quantité de chacune de ces espèces est bien connue ; elle s'exprime en terme de rendement radiolytique, c'est-à-dire en nombre de moles formées par unité d'énergie absorbée (le Joule). Les valeurs de ces rendements sont données figure 2 [10]. En présence d'oxygène (milieu aéré), les radicaux e^-_{aq} et $\text{H}\cdot$ réagissent avec O_2 pour donner respectivement les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ et HO_2^{\cdot} . Ces derniers sont liés entre eux par un équilibre acido-basique dont le pKa est égal à 4,8. Par conséquent, la radiolyse de l'eau, en générant les radicaux hydroxyle et superoxyde, mime parfaitement les conditions d'un stress oxydant. Un phénomène similaire se produit lors d'irradiations (accidentelles ou thérapeutiques) d'organismes vivants, puisque ces derniers sont constitués majoritairement d'eau (70 à 80 % en poids). Les ERO générées par radiolyse de l'eau provoquent des dommages oxydatifs, au même titre que ceux impliqués dans le stress oxydant résultant d'un déséquilibre du métabolisme de l'oxygène.

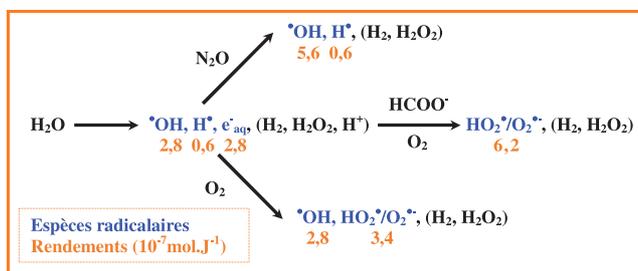


Figure 2 - Production d'espèces radicalaires en quelques nanosecondes par radiolyse de l'eau (rayons γ).

Entre parenthèses, espèces non radicalaires également produites par radiolyse. Selon la nature des solutés dissous dans l'eau (N_2O , $\text{HCOO}\cdot/\text{O}_2$, O_2), il est possible de sélectionner les radicaux libres $\cdot\text{OH}$ et/ou $\text{O}_2^{\cdot-}$, afin de pouvoir les étudier spécifiquement.

La mise en œuvre de la méthode de la radiolyse est relativement aisée. Il suffit de dissoudre dans l'eau, en faible concentration, un substrat bioorganique choisi (ADN, protéine, lipide...) et de soumettre la solution à l'action des rayonnements ionisants (rayons X, rayons γ , faisceaux d'électrons...). Tant que la concentration de substrat est inférieure à 10^{-2} mol.L $^{-1}$, celui-ci ne subit pas d'ionisation directe par les rayonnements ionisants mais il est soumis à l'attaque des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau. Deux méthodes d'analyse des processus radicalaires peuvent être utilisées : la radiolyse gamma et la radiolyse pulsée. En radiolyse gamma (ou radiolyse à l'état quasi-stationnaire), des durées d'irradiation croissantes (de quelques minutes

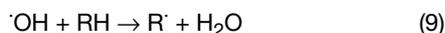
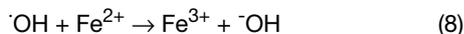
à quelques heures) conduisent à des concentrations « cumulées » croissantes de radicaux libres, tandis que leurs concentrations « instantanées » restent extrêmement faibles (par exemple 10^{-10} à 10^{-12} mol.L $^{-1}$ pour les radicaux $\cdot\text{OH}$), en raison de la grande réactivité de ces radicaux. Il n'est donc pas possible de doser les espèces radicalaires pendant les irradiations. En revanche, le substrat transformé peut être analysé après chaque irradiation. En radiolyse pulsée, l'irradiation a lieu pendant une durée extrêmement courte (par exemple 10^{-9} s), générant des radicaux en concentrations relativement élevées (10^{-6} à 10^{-4} mol.L $^{-1}$). Par conséquent, il est possible d'analyser les espèces radicalaires en temps réel, à l'échelle de quelques nanosecondes. L'une des principales voies de caractérisation des radicaux libres est la spectrophotométrie d'absorption qui permet, en outre, de les quantifier. Les cinétiques de formation et de disparition des transitoires radicalaires peuvent alors être suivies, en temps réel (de 10^{-9} à plusieurs secondes), à l'aide d'enregistreurs appropriés. Les propriétés physico-chimiques (constantes de vitesse, constantes d'équilibre, potentiels d'oxydoréduction, coefficients d'extinction molaire...) des radicaux libres oxygénés $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2^{\cdot-}$, ainsi que de nombreux autres radicaux libres dérivant de molécules biologiques ont ainsi pu être déterminées. De plus, grâce aux données cinétiques ainsi acquises, les mécanismes de formation des lésions oxydatives (initiées par les radicaux libres oxygénés) ont pu être établis d'une manière rigoureuse pour de nombreux composés d'intérêt biologique.

La méthode que nous venons de décrire présente en outre l'intérêt de pouvoir choisir et isoler le radical initiateur (hydroxyle ou superoxyde) à l'aide de capteurs appropriés. C'est ainsi qu'irradier une solution désaérée et saturée de gaz N_2O , permet d'éliminer tous les radicaux e^-_{aq} au profit des radicaux $\cdot\text{OH}$ qui sont alors produits sélectivement (figure 2). De même, irradier une solution aqueuse contenant du formiate de sodium offre la possibilité de transformer tous les radicaux libres de la radiolyse de l'eau ($\cdot\text{OH}$, $\text{H}\cdot$ et e^-_{aq}) en radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui sont alors les seules espèces radicalaires sélectionnées (figure 2). Enfin, la méthode de la radiolyse n'est pas limitée à l'étude des solutions aqueuses. En effet, l'irradiation de solvants autres que l'eau, et en particulier de l'éthanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), permet de générer des radicaux peroxydes RO_2^{\cdot} ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{O}_2^{\cdot})\text{OH}$) qui servent de modèles à la détermination des propriétés des peroxyradicaux (autres espèces radicalaires du stress oxydant) vis-à-vis de nombreux substrats bioorganiques insolubles dans l'eau.

Effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire

Les radicaux hydroxyles sont les ERO les plus dommageables du stress oxydant, en raison de leur extrême réactivité qui se traduit par des constantes de vitesse ($k(\cdot\text{OH} + \text{substrat})$) comprises entre 10^8 et 10^{10} mol $^{-1}$.L.s $^{-1}$. Ces constantes de vitesse sont dites limitées par la diffusion, c'est-à-dire limitées seulement par le mouvement des molécules et non par une barrière énergétique (énergie d'activation). Par conséquent, la durée de vie des radicaux $\cdot\text{OH}$ est extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles (inférieures à la dizaine de nanomètres). Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production, à l'opposé des radicaux superoxydes qui, comme nous le verrons, « ont le temps »

de diffuser en raison de leur relative inertie chimique. Les radicaux hydroxyles attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides...). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction (8)), soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH, réaction (9)), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (réaction (10)).



Par exemple, dans le cas de l'ADN, le radical hydroxyle réagit avec les bases en s'additionnant sur les doubles liaisons (figure 3) [11]. Le radical hydroxyle peut également réagir avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires et des lipoprotéines, initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique. De même, les acides aminés constitutifs des protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux hydroxyles. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif [12].

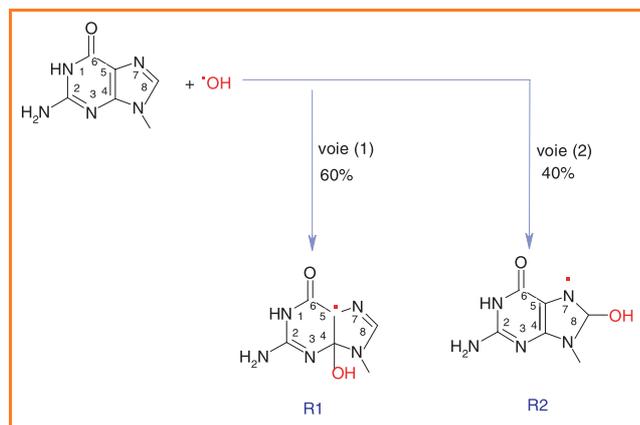
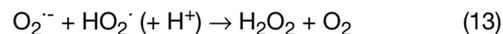


Figure 3 - Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) avec une base de l'ADN, la guanine.

Deux radicaux libres sont formés : R1 (centré sur l'atome de carbone 5) et R2 (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R2) donne naissance à la 8-oxo-guanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN.

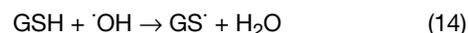
Paradoxalement, les radicaux superoxydes sont eux-mêmes peu réactifs vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides et leurs constituants). Cela se traduit en terme de cinétique par des constantes de vitesse ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{substrat})$) plutôt faibles, généralement inférieures à $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce sont donc des espèces dont la durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) et qui peuvent diffuser bien au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible. Toutefois, il existe très peu de cibles privilégiées des radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$; citons à titre d'exemple les SOD (dont $\text{O}_2^{\cdot-}$ est le substrat, $k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{SOD}) = 2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), le cytochrome c(Fe^{3+}) ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{cytc}(\text{Fe}^{3+})) = 2,6 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), ou encore l'ascorbate ($k(\text{O}_2^{\cdot-} + \text{ascorbate}) = 2,7 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) [8]. En réalité, la toxicité des radicaux superoxydes semble s'exercer plutôt d'une manière indirecte. En effet, en réagissant avec l'eau oxygénée, les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ peuvent donner naissance à des radicaux $\cdot\text{OH}$ (réaction (11), dite

de Haber Weiss, catalysée par Fe^{3+}) ou bien encore, en réagissant avec des radicaux $\cdot\text{NO}$ (monoxyde d'azote, radical centré sur l'azote), conduire à l'apparition de peroxy-nitrites (réaction (12)) dont la toxicité est maintenant bien établie [13]. En outre, la dismutation spontanée des radicaux superoxydes (réaction (13)) est suffisamment rapide, même en l'absence de SOD ($k = 9,7 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), pour que la production d'eau oxygénée soit en elle-même un phénomène délétère via les réactions de Fenton (réaction (7)) et de Haber Weiss (réaction (11)), c'est-à-dire via la production de radicaux hydroxyles.



Il est important de noter le rôle de second messenger que les radicaux superoxydes peuvent jouer au niveau des mécanismes de signalisation cellulaire. Ils sont ainsi impliqués dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée), dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires), dans l'adhésion des monocytes (types de globules blancs) aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire. De plus, les radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont capables de modifier l'activité enzymatique de tyrosine kinases et de sérine/thréonine kinases (telles que les « mitogen-activated protein kinases » ou MAPK), conduisant en aval à activer des facteurs de transcription (protéines spécifiques) qui vont initier l'expression de gènes « redox-sensibles ».

L'ensemble des dommages radicalaires semble pouvoir être limité, tout au moins en partie, par l'action de molécules dites antioxydantes. Celles-ci ont pour rôle d'empêcher les ERO d'atteindre leurs cibles biologiques, d'où leur fonction de protecteur chimique. Il est habituel de dire qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. Toutefois, cette condition n'est pas suffisante ; il faut en outre que l'antioxydant soit régénéré (recyclé) *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle. Parmi les antioxydants non enzymatiques se trouvent les thiols (fonction SH) dont certains sont synthétisés *in vivo*, comme le glutathion (symbolisé ici par GSH). Le glutathion est un tripeptide dont la concentration intracellulaire est importante puisqu'elle est de l'ordre de 10^{-4} à $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [8]. La fonction thiol confère au glutathion un rôle d'antioxydant, c'est-à-dire de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées, et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée (voir réaction (6)) et des radicaux hydroxyles (réaction (14)). Toutefois, le rôle protecteur de GSH semble provenir de sa capacité à réagir avec les radicaux centrés sur le carbone R \cdot (réaction (15)). En effet dans ce cas, un phénomène de « réparation » des radicaux R \cdot en RH se produit [14], par opposition à l'oxydation possible des radicaux R \cdot par O_2 , donnant naissance à des radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$.



Cependant, les radicaux thiyles $\text{GS}\cdot$ formés lors des réactions (14) et (15) sont loin d'être eux-mêmes « inoffensifs » car leurs réactions ultérieures peuvent générer de nouveaux radicaux libres susceptibles d'initier à leur tour des dommages moléculaires. Par conséquent, l'effet protecteur des thiols reste relativement limité. La

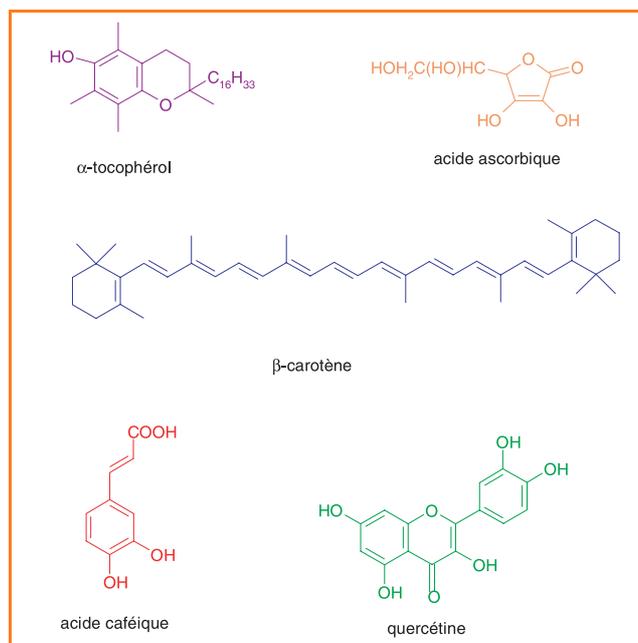
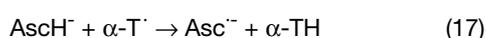
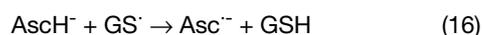


Figure 4 - Antioxydants d'origine alimentaire : α -tocophérol (vitamine E), acide ascorbique (vitamine C), β -carotène (famille des caroténoïdes), acide caféique et quercétine (famille des polyphénols).

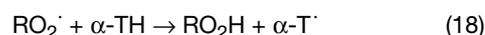
régénération de la fonction thiol SH semble se faire, *in vivo*, à l'aide d'autres réducteurs tels que l'ascorbate.

Les antioxydants d'origine alimentaire, comme l'ascorbate, les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols (figure 4), exercent des effets protecteurs importants *in vivo*. La concentration d'ascorbate (vitamine C) est comparable à celle du glutathion puisqu'elle peut atteindre 10^{-3} mol.L⁻¹ dans certains types cellulaires. La molécule d'acide ascorbique (figure 4) et sa forme déprotonée, l'ascorbate (présent majoritairement à pH physiologique), sont des agents réducteurs. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, mais aussi avec les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ (et leur forme protonée $\text{HO}_2\cdot$), ce qui est tout à fait remarquable puisque ces derniers sont connus pour être très peu réactifs. En outre, l'ascorbate capte les radicaux peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate (symbolisé ici par AscH^+) est oxydé en radical ascorbyle $\text{Asc}^{\cdot-}$ qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Par conséquent, à l'opposé du radical thiyle GS^{\cdot} susceptible d'initier de nombreuses réactions secondaires, le radical ascorbyle $\text{Asc}^{\cdot-}$ ne développe pas de réactions ultérieures dommageables. Une propriété importante de l'ascorbate est la « réparation » possible de deux autres antioxydants, le glutathion et l' α -tocophérol (symbolisé par $\alpha\text{-TH}$) à partir de leurs formes radicalaires (réactions (16) et (17)). L'ascorbate est recyclé, tout au moins en partie, par dismutation du radical ascorbyle.



Parmi les tocophérols naturels (d- α , d- β , d- γ et d- δ -tocophérols), le d- α -tocophérol (vitamine E) est celui qui est le plus efficace *in vivo*. C'est un antioxydant liposoluble, en raison de sa longue chaîne aliphatique comportant 16 atomes de carbone (figure 4), ce qui le différencie nettement

de l'ascorbate qui, lui, est hydrosoluble. Le d- α -tocophérol est donc localisé parmi les chaînes d'acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines. Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques $\text{RO}_2\cdot$ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (symbolisée ici par $\alpha\text{-TH}$), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, $\alpha\text{-T}^{\cdot}$, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (réaction (18)). De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $\text{HO}_2\cdot$), les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$, ainsi que l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (espèce réactive de l'oxygène, non radicalaire). Bien que la concentration d' α -tocophérol soit relativement faible *in vivo* ($2 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ dans le sang), le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate (réaction (17)), lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises.



Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène (famille des caroténoïdes), l'acide caféique et la quercétine (famille des polyphénols) (figure 4). Caroténoïdes et polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace semble-t-il que ne le fait l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire. L'ensemble de ces propriétés antioxydantes permettrait d'expliquer, tout au moins en partie, les bénéfices apportés par les régimes alimentaires basés sur une consommation de fruits, de légumes, de thé et de vin rouge (en quantité modérée).

Conclusion

Les espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radicaux libres superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$ et hydroxyles $\cdot\text{OH}$) sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Les radicaux hydroxyles sont les espèces les plus agressives et donc les plus dommageables du stress oxydant, tandis que les radicaux superoxydes semblent peu réactifs. Toutefois, ces derniers demeurent des espèces potentiellement toxiques *via* leurs réactions avec le peroxyde d'hydrogène ou le monoxyde d'azote, générant respectivement des radicaux hydroxyles et des anions peroxydites, tous deux très délétères vis-à-vis des matériaux biologiques. La majeure partie des connaissances acquises sur les oxyradicaux est le résultat d'études modèles effectuées par radiolyse de l'eau (ou de l'éthanol) *in vitro*. La radiolyse est un outil précieux pour la détermination rigoureuse des mécanismes bioradicalaires puisqu'elle permet non seulement de produire sélectivement les oxyradicaux, mais également d'analyser quantitativement leurs réactions vis-à-vis de nombreuses cibles biologiques ainsi que vis-à-vis des

antioxydants. Ces données ont permis une meilleure compréhension des phénomènes de stress oxydant *in vivo* impliqués dans plusieurs pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives...), ainsi que dans les processus de vieillissement. La recherche sur les oxyradicaux et sur les antioxydants reste donc parfaitement d'actualité car de nombreux mécanismes bioradicalaires restent encore à préciser, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Références

- [1] Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L., *N. Engl. J. Med.*, **1989**, 320, p. 915.
 [2] Bonnefont-Rousselot D., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2002**, 5, p. 561.
 [3] Klein J.A., Ackerman S.L., *J. Clin. Invest.*, **2003**, 111, p. 785.
 [4] Jenner P., *Ann. Neurol.*, **2003**, 53, p. S26.
 [5] Migliore L., Coppedè F., *Mut. Res.*, **2002**, 512, p. 135.
 [6] Cadenas E., Davies J.A., *Free Radic. Biol. Med.*, **2000**, 29, p. 222.
 [7] Griending K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M., *Circ. Res.*, **2000**, 86, p. 494.
 [8] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, **1999**.
 [9] Wardman P., Candeias L.P., *Radiat. Res.*, **1996**, 145, p. 523.
 [10] Spinks J.W.T., Woods R.J., Water and inorganic aqueous systems (chap. 7), *Introduction to Radiation Chemistry*, J. Wiley & Sons Inc., New York, **1990**, p. 243.
 [11] Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S., *Mut. Res.*, **1999**, 424, p. 9.
 [12] von Sonntag C., Enzymes (chap. 14), *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, Londres, **1987**, p. 429.
 [13] Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A., *Pharmacol. Rev.*, **1991**, 43, p. 109.
 [14] Lal M., *Radiat. Phys. Chem.*, **1994**, 43 (6), p. 595.



M. Gardès-Albert

Monique Gardès-Albert¹ est professeur à l'Université René Descartes (Paris 5) et responsable du Laboratoire de chimie-physique*.

Dominique Bonnefont-Rousselot² est professeur à l'Université René Descartes et praticien hospitalier à l'Hôpital de la Salpêtrière (AP-HP)**.

Zohreh Abedinzadeh³ est professeur à l'Université René Descartes*.



Z. Abedinzadeh

Daniel Jore⁴ est professeur à l'Université René Descartes et directeur de l'UFR Biomédicale des Saints-Pères*.



D. Bonnefont-Rousselot



D. Jore

* Laboratoire de chimie-physique, UMR 8601 CNRS, UFR Biomédicale des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06.

** Laboratoire de biochimie métabolique et clinique (EA 3617), Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06.

¹ Tél. : 01 42 86 21 79. Fax : 01 42 86 22 13.

Courriel : gardes@biomedicale.univ-paris5.fr

² (UFR) Tél. : 01 53 73 96 13. Fax : 01 53 73 97 08.

Courriel : dominique.rousselot@psl.ap-hop-paris.fr

³ Tél. : 01 42 86 22 65. Fax : 01 42 86 83 87.

Courriel : abedinzadeh@biomedicale.univ-paris5.fr

⁴ Tél. : 01 42 86 21 74. Fax : 01 42 86 22 13.

Courriel : jore@biomedicale.univ-paris5.fr