

UE 1 : Biochimie

Pr H Puy

Le 15/10/12 à 8h30

Permutation de cours sur le planning avec le professeur Puy. Le cours de De Thé aura lieu le lundi 19 novembre.

Ronéotypeur : Elisabeth Boureille

Ronéolecteur : Valentin Chamoin

Cours n°7 : Introduction aux radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène

Ronéo n°4

Plan du cours

I- Généralités

A/ L' Oxygène

B/ ROS (espèces réactives de l'oxygène)

II- Radicaux libres

A/ Définitions

B/ Production des radicaux libres

C/ Le mode d'action des radicaux

D/ Les différents radicaux

E/ Schéma Bilan

III- Les origines des radicaux

IV- Les méfaits des radicaux libres

V- Les mécanismes de défense et d'adaptation au stress oxydant

A/ Le confinement en organelles

B/ Les systèmes de protection non spécifiques

C/ Les systèmes de protection spécifiques

D/ Le système glutathion

E/ Le rôle des oligoéléments dans le mécanisme anti-radicalaire

Je préfère prévenir tout de suite : ce cours est très redondant, le prof revient plusieurs fois sur les même choses. Pensez surtout à bien revoir les éléments que le prof a relevé pour ses questions. Bon courage !

I- Généralités

A/ l' Oxygène

L'oxygène est indispensable à la vie des êtres pluricellulaires vivant en aérobie. Il existe cependant des micro-organismes pour lesquels l'oxygène est inutile et même toxique : ceux vivant en anaérobie.

Cet oxygène est nécessaire pour le **transfert d'électrons** couplé aux phosphorylations oxydatives qui sont la principale **source d'énergie** de l'organisme. Son absence, l'anoxie, est mortelle à court terme. Elle entraîne la chute d'ATP dans la cellule par l'interruption du processus énergétique.

Les tissus résistent inégalement à l'anoxie :

-Le cerveau est détruit en 3 minutes car il est incapable d'utiliser les lipides pour subvenir à ses besoins énergétiques et est ainsi dépendant de la respiration.

-Le foie, les reins et le myocarde sont détruits en quelques heures leur permettant d'être utilisés plus couramment en transplantation.

-Les muscles, la peau et les phanères sont détruits beaucoup plus tard.

Ainsi les greffons ont des délais de survie différents selon leur capacité à résister à l'anoxie.

Cependant l'oxygène possède un **caractère toxique** pour les organismes et son utilisation requiert des mécanismes protecteurs face à son pouvoir oxydant. On peut par exemple citer le globule rouge qui possède un mécanisme de protection anti-radicalaire. Il produit des **réactions d'oxydo-réduction** qui peuvent être toxiques et participer à la pathogénie de nombreuses maladies.

L'oxygène moléculaire diatomique (O_2) joue un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie comme **accepteur terminal d'électrons**.

Les espèces oxygénées réactives sont des produits normaux du métabolisme. Leur production basale correspondrait à **3 %** de la quantité totale d'oxygène consommé.

L'échappement de la chaîne respiratoire a lieu beaucoup plus avec l'âge. Il fait parti du processus de vieillissement physiologique, mais peut aussi être pathologique. Le système de défense face au stress oxydatif diminue aussi avec l'âge.

NB. Exemple physiologique : L'échappement de la production de H_2O_2 va entraîner un blanchiment des cheveux.

B/ ROS (espèces réactives de l'oxygène)

Ces réactions d'oxydo-réduction sont médiées par des espèces réactives l'oxygène : les ROS (ou EROS). Ces ROS peuvent être le fruit de « bavures » de réactions impliquant l' O_2 et des **ions métalliques** (en particulier les flavoprotéines, et surtout les oxydases). Ou bien être les produits de réactions physiologiques.

Voici les principales ROS :

-Ion superoxyde (O₂⁻)

-Radical hydroxyle (OH·)

-Ion hydroxyle (OH⁻)

-Peroxyde d'hydrogène.

Ils proviennent surtout de la chaîne respiratoire mais pas uniquement . **Il peut y avoir des ROS non radicalaire, mais tous les radicaux sont des ROS .**

II- Radicaux libres

A/ Définitions

Définition d'un radical libre : Un radical libre (RL) est constitué par tout atome, groupe d'atomes ou molécules où **au moins un électron non apparié** occupe une orbitale externe [°].

Le radical s'en trouve doté d'une **réactivité particulière** et peut ainsi **réagir avec d'autres atomes ou molécules** et se comporter, selon le cas, **comme un oxydant ou comme un réducteur**, afin d'apparier son électron célibataire. Il aura donc tendance soit à donner son électron, soit à créer une liaison pour combler son orbitale.

Le stress oxydant est observé lorsque la **production des espèces oxygénées réactives dépasse les capacités de défense des tissus**. Il entraîne des altérations des composants cellulaires par réactions chimiques des espèces oxygénées réactives avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques cellulaires .

Concernant les lipides il peut y avoir des peroxydations touchant les membranes ou les lipoprotéines qui transportent les lipides dans le sang : Les LDL cholestérol vont se peroxyder entraînant leur phagocytose par les macrophages. Ces derniers spumeux et se déposeront sur la paroi des vaisseaux contribuant ainsi à la plaque d'athérosclérose. Les prostaglandines aussi peuvent être produites en cas de stress oxydant. Enfin, pour les acides nucléiques, on peut aussi citer des problèmes de réparation de l'ADN, réplication, transcription,...

En conclusion, on peut retenir que :

Un "radical libre" (RL) est une espèce chimique

- qui possède un électron non apparié ('célibataire')

- qui a une existence indépendante ('libre')

- un RL est généralement écrit R·

- certains radicaux sont électriquement neutres tandis que d'autres sont chargés : il existe des radicaux cationiques R^{·+} et des radicaux anioniques R^{·-}

B/ Production des radicaux libres

Pour passer de l'O₂ à l'eau il y a besoin de 4 e⁻ venant de la chaîne respiratoire. **Les formes radicalaires sont les intermédiaires dans cette transition**. Les espèces réactionnelles de l'O₂ ne sont pas indépendantes les unes des autres, elles agissent en **cascade** : leur degré de réactivité est modulable.

Certaines étapes de cette cascade font parti de la détoxification.

Il faut bien faire la distinction entre le stress oxydant qui est pathologique et la production d'espèces radicalaires qui est physiologique. De plus on rappelle que les ROS est un terme général qui intègre à la fois des espèces radicalaires et non radicalaires.

Formes réactives de l'oxygène (ROS)	
Formes radicalaires (RLO)	Formes non radicalaires
superoxyde O_2^\bullet	peroxyde d'hydrogène H_2O_2
hydroxyle OH^\bullet	acid hypochloreux $HOCl$
peroxyde ROO^\bullet	ozone O_3
alkoxyde RO^\bullet	oxygène singulet $^1\Delta_g$
hydroperoxyde HOO^\bullet	peroxynitrite $ONOO^-$

Nb : Dans le tableau R correspond à des radicaux lipidiques, protéiques, glucidiques, ...

L'ozone qui n'est que peu produit chez l'homme peut être trouvé dans l'atmosphère et nous protège des radiations.

L'ion superoxyde peut être le fruit d'un dérapement de la chaîne mitochondriale (dans 3% des cas). Les NADPH-oxydases (NOX) peuvent conduire elles aussi à la production de cet anion très oxydant qui sera détoxifié de manière à la fois **spontanée et enzymatique** en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce sont les superoxyde-dismutases (SOD) qui catalysent cette réaction.

Les réactions enzymatiques nécessitent l'utilisation de Fe^{2+} ou Cu^{2+} car ils vont contribuer aux échanges dans les réactions.

Enfin, uniquement dans les **globules blancs**, il y a une dernière étape permettant la production d'acide hypochloreux (HOCl) grâce aux myéloperoxydases (MPO). L'acide hypochloreux (ou eau de javel) est produit par les globules blancs pour détruire les bactéries phagocytées.

Les espèces radicalaires évoluent donc en cascade pour **contribuer aux mécanismes de défense**. En cas de mutation des enzymes NOX, SOD ou MPO il peut y avoir une diminution de production des radicaux libres luttant contre les bactéries. On a donc pu observer des enfants très sensibles aux infections dues à ces mutations.

Produire trop ou pas assez de radicaux peut être délétère, il y a surtout une **notion d'équilibre** à respecter.

Outre les moyens enzymatiques on retrouve des **facteurs physico-chimiques** responsable de la production de radicaux libres qui peuvent contribuer à la cancérogénèse. On peut citer les UVA, mais aussi les métaux quinones et les oxydases. **Des dérivés nitrés** peuvent être apportés par le milieu extérieur (médicaments, pesticides,...) et conduire à la production d'oxyde nitrique et de peroxynitrique par l'adjonction d' O_2 .

Ce même peroxynitrite, qui est un composé très instable, est synthétisé à partir de l'arginine sous le contrôle d'enzyme : les NO-synthases (NOS). Ces dernières réactions seront surtout dans le **lit vasculaire** (les dérivés nitré permettent la vasodilatation et sont utilisé dans le viagra ou la trinitrine).

C/ Le mode d'action des radicaux

On a pu voir que la MPO est spécifique des globules blancs.. Les NOS sont surtout retrouvés dans les vaisseaux. Ainsi ces réactions sont à la fois **ubiquitaires** et très **tissus dépendant**.

Les radicaux ont une **durée de vie très courte**, agissent à **concentration très faible** et en **très peu de temps**. Ceci leur confère un **effet local** par rapport à leur lieu de production : un **effet juxta-production**.

L'action des Ros est surtout ciblée pour la défense contres les micro-organisme :

- Les globules blancs utilisent l'O₂ pour **tuer les bactéries qu'ils ont phagocytées**.
- Les monocytes et polynucléaires neutrophiles ont un mécanisme spécial pour créer des radicaux libres oxygénés. Dans les polynucléaires neutrophiles, la NADPH-oxydase permet la **microbicidie**.
- Ils permettent d'activer le complément qui permet la **défense anti-infectieuse**.

D/ Les différents radicaux

Il existe deux formes activées de l'oxygène (*le prof est passé très vite dessus*)

-L'oxygène singulet existe sous deux formes selon la position de ses électrons (question de spin) dans les couches.

-L'anion super oxyde (O₂^{•-}) est obtenu par la capture d'un électron par l'oxygène singulet. Il est produit majoritairement par la chaîne mitochondriale, mais également par les oxydases.

Concernant les radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène peut être obtenu soit par oxydation soit par dismutations. Celui ci réagit avec **le fer, composé pouvant être toxique pour les cellules**. Ainsi le peroxyde d'hydrogène participe à un **mécanisme de protection**.

Le plus important des produits est le radical hydroxyle (OH[•]). C'est une espèce oxygénée très réactive qui provient de la coexistence de l'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Comme on a vu précédemment le peroxyde d'hydrogène réagit avec le fer (forme ferreux) et produit du fer oxydé (forme ferrique) et le radical hydroxyle. C'est la **réaction de Fenton**.



Ensuite le fer ferrique est réduit en fer ferreux par l'anion super oxyde principalement.



L'ensemble de ces réactions forme **la réaction d'Haber Weiss**.



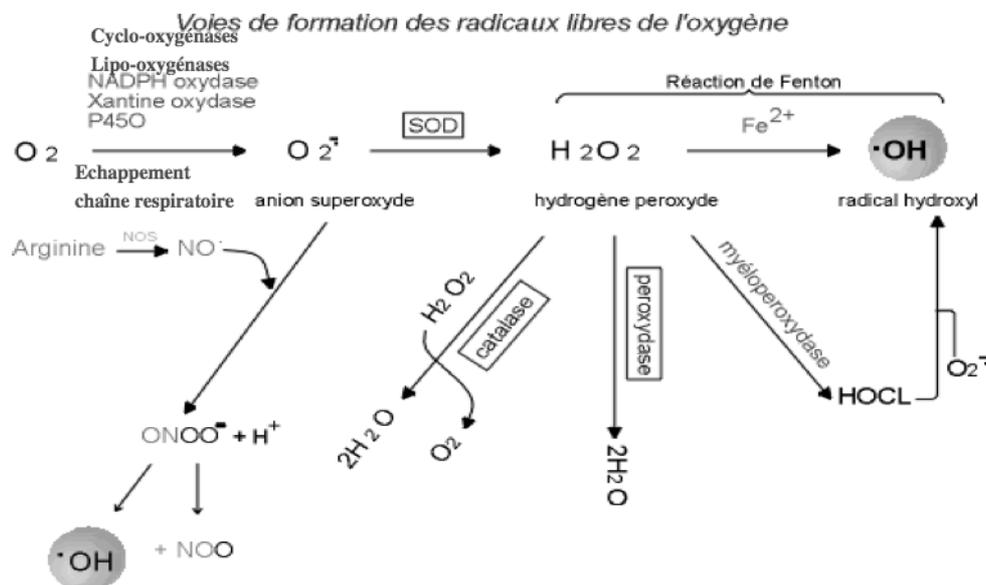
Nb : le fer n'est jamais laissé sous forme ferreux (Fe²⁺) car est trop réactif. Il est pris en charge par la transferrine dans sa forme ferrique (Fe³⁺).

L'ion hypochloreux est crée par l'action des myéloperoxydases (MPO) dans les globules blancs. Il peut être responsable de différentes **pathologies inflammatoires** (granulomatoses), par exemple, par manque de production et de dégradation d'agents infectieux.

Le monoxyde d'azote par concomitance avec un ion superoxyde va entrainer la formation de peroxynitrite qui est hautement cytotoxique. Cette réaction est surtout retrouvée au niveau des vaisseaux sanguins.

E/ Schéma Bilan

Les 6 façons de créer l'anion superoxyde sont à retenir en +++ (fois 1000). Cela fait parti des questions que le prof souhaite poser.



1) Il existe 6 façons de créer des anions superoxyde :

- À partir de l' O_2 via échappement de la chaîne respiratoire. Dans 95-97% des cas le dioxygène subira une tétraréduction et arrivera au bout de la chaîne en formant l'eau. Dans **3-5%** des cas il y aura simplement une monoréduction, ce qui correspond à l'échappement à la chaîne respiratoire.

Ensuite 5 classes d'enzymes peuvent intervenir pour introduire les radicaux :

- Les cyclo-oxygénases (ubiquitaires) : elles se chargent du **métabolisme de l'acide arachidonique**, des prostaglandines et prostacyclines. Elles ont donc un rôle dans le métabolisme de l'aspirine ou des corticoïdes.
- Les lipo-oxygénases : elles interviennent dans la même cascade. Elles produisent des leucotriènes.
- Les NADPH oxygénase (NOX) : on les retrouve surtout **dans les globules blancs pour les mécanismes de défenses** en créant volontairement des radicaux.
- Les Xanthine oxydase : Ce sont des enzymes ubiquitaires mais présentes en plus au grand au niveau hépatique. Elles servent à **former l'acide urique** en présence de son cofacteur, le NADPH. Elles jouent un rôle important dans le **catabolisme des bases puriques** et sont responsables d'une des **plus grosse production de l'anion superoxyde après l'échappement de la chaîne respiratoire**.
- Les cytochromes p450 : On les retrouve dans le foie et les reins. Ils interviennent dans le **métabolisme des xénobiotiques** au niveau du cytosol (ils rendent actifs certains médicaments, les pro-drogues). De plus ils ont des **actions oxydo-réductrices pour les déchets** qu'ils soient endogènes ou exogènes. Le réticulum endoplasmique est riche en cytochromes p450 et se voit impliqué dans les processus de détoxification. Ce sont des **enzymes hémiques**, contenant donc du fer.

Non présentes sur ce schéma mais bien existantes : les réactions physiques et chimiques jouent un rôle non négligeables.

2) À partir de l'anion superoxyde les superoxydes-dismutase (SOD) vont produire du peroxyde d'hydrogène (moins toxique). De celui-ci peuvent se faire plusieurs réactions :

-La réaction de Fenton qui a lieu pour **pallier à l'excès de fer** sous forme ferreux tout en formant un radical hydroxyle.

-Les MPO dans globules blancs permettent la **formation d'acide hypochloreux** qui jouera un rôle lors de la phagocytose.

-Les peroxydases et catalases qui sont des enzymes de **détoxification et de protection du stress en formant de l'eau**.

3) L'arginine par l'action des NOS donne de l'acide nitreux qui réagit lui-même avec l'anion superoxyde afin de former du peroxynitrite.

L'ensemble de ces enzymes peuvent en cas de déficience poser des soucis sur le plan physiologique. On rappelle l'importance de l'**équilibre** de la production.

En cas de prise de médicaments anti-radicalaires libres en excès, on peut assister à une inhibition de la protection par les différents mécanismes. Les enzymes seront activées à l'état basal à un niveau inférieur, ce qui fait qu'en l'absence de traitement la protection contre les radicaux n'est pas assurée et l'on assiste à une augmentation du nombre de cancers.

Pour conclure **les ROS sont des espèces réactives physiologiques** (ou pathologiques pour la formation de quelques unes), certaines étant radicalaires, d'autres non. **Leur chef de file est l'anion superoxyde** qui va subir différentes cascades **tissu-spécifiques** en fonction des circonstances (Excès Fe^{2+} , NOS dans la paroi vasculaire, MPO dans les globules blancs,...)

III- Les origines des radicaux

Elles peuvent être de différents types :

- Physiologiques : respiration, hormones, cytokines, phagocytose
- Physiopathologiques : déficit en GSH (glutathion réduit), déficit enzymatique, maladie mitochondriale (rendement en baisse), inflammation,...
- Physique ou chimique : irradiation, xénobiotiques oxydants (médicaments, polluants)
- Autres stress: stress du réticulum (maladies lysosomales), stress thermique (hyperthermie), hypoxie, stress mécanique....

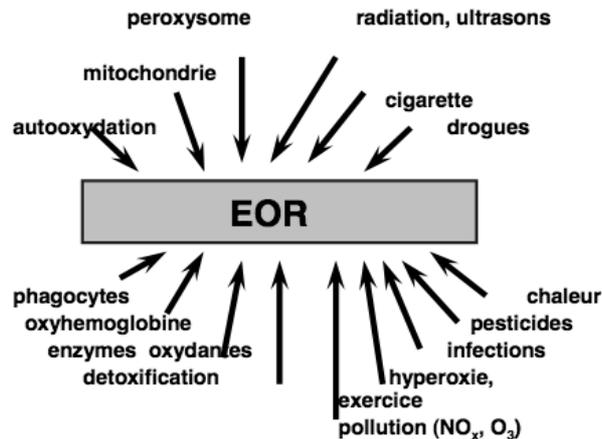
Certaines oxydoréductases utilisent l' O_2 sans production d'énergie :

- Les oxygénases fixent une molécule d' O_2 sur les substrats
- Les oxydases oxydent les atomes d'hydrogène des substrats en H_2O_2
- Les hydroxylases fixent un OH sur une chaîne carbonée

Parmi ces enzymes productrices de radicaux, les plus importantes sont celles générant de l'**auto-oxydation**. Par exemple les cyclo-oxygénases, les lipo-oxygénases et les xanthine oxydases qui jouent un rôle dans le catabolisme de l'acide urique avec son co-facteur le NAD. Cette dernière enzyme induit une amplification de la formation des radicaux car produit deux fois de l'anion superoxyde à partir de

l'hypoxanthine et de la xanthine.

À l'échelle de l'individu, de nombreux facteurs rentrent en jeu de façon permanente.



(Hypoxanthine → Xanthine → Acide urique)

On relèvera principalement :

- des sources endogènes : la mitochondrie surtout, mais aussi le peroxysome.
- des sources exogènes : radiation, la cigarette (responsable de cancers de la lèvres inférieure potentialisé par la chaleur du mégot), exercice physique excessif (entraînant plus d'échappement de la chaîne respiratoire).

Nb : L'hyperoxie peut avoir lieu après AVC ou transplantation lors de la reperfusion de l'organe par du sang. Celui-ci apportant de nouveaux des molécules O₂ et les systèmes ayant été ralentis suite à l'incident, il peut y avoir une forte production de ROS.

Les mitochondries sont la principale source de production de radicaux libres

Mitochondries	microsome	peroxysome	cytosol
45%	20%	30%	5%

Exception pour le foie, où les microsomes sont les principaux producteurs

Mitochondries	microsome	peroxysome	cytosol
15%	45%	35%	5%

(Les diapos concernant les peroxysomes et le mécanisme de genèse des ROS ont été passées par le prof)

IV- Les méfaits des radicaux libres

Les ROS ont des :

- Effets physiologiques : croissance cellulaire, inflammation
- Effets d'adaptation au stress oxydant : induction des gènes « anti-oxydants » et répression des gènes « pro-oxydants »
- Effets toxiques : ADN, ARN, lipides, protéines

Quelques exemples d'effets toxiques (qui peuvent être stimulés par les radiations ionisantes) :

- Mutations de l'ADN
- Peroxydation des lipides
- Altération des protéines
- Perturbation de la transduction des signaux
- Modulation des gènes et des protéines de stress régulant la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose

Et plus précisément les ROS ont des effets toxiques sur :

-L'ADN : génotoxicité suite à l'exposition au stress oxydant qui va induire la formation de **8-OH-Guanine** qui est une analogue de base de l'ADN. Celle-ci est potentiellement inductrice de dérapage dans l'ADN entraînant des mutations et donc des cancers.

-L'ARN peut subir des oxydations et donc des **altérations dans la formation des protéines**.

-Les lipides pourront subir une peroxydation ce qui pourra jouer un rôle dans la **formation de l'athérosclérose**.

-Les protéines peuvent subir des **oxydations** surtout sur les groupes SH des cystéines et des méthionines. Elles peuvent aussi subir aussi des nitrosylation, des carbonylation ou encore recevoir des signaux de dénaturation au cours d'agrégations de protéines anormales (Maladie de Parkinson ou Alzheimer).

-Les glucides peuvent subir des **anomalies de glycation** et induire un diabète

(le prof à ensuite passé en revue les formules des différents molécules évoquées. Il a bien signifié que cela n'avait pas d'importance pour lui, d'où le fait que volontairement nous vous en fassions grâce)

V- Les mécanismes de défense et d'adaptation au stress oxydant

La première ligne de défense fait intervenir des **molécules anti-oxydantes** servant de **tampon immédiat**.

- le glutathion (sous forme réduite –SH) qui protège les globules rouges
- la vitamine C (acide ascorbique) qui est anti-oxydant hydrosoluble
- la vitamine E (tocophérol), lipophile
- la biliverdine, un produit de la dégradation de l'hème par l'hème oxygénase

La deuxième ligne de défense est l'**induction ou la répression des gènes**. Ceux ayant des activités enzymatiques **anti-oxydantes seront activés** : GPx (peroxydases), Catalases, SOD, Hème oxygénase... Ceux avec des activités **pro-oxydantes seront inhibés** : Cytochromes, oxydases... On aura aussi diverses réparations : ADN, protéines (Trx, Trx réductase, chaperon).

Enfin, la dernière ligne de défense pour éviter des effets trop délétères sur l'organisme (suite aux mutations) est l'**apoptose**.

La protection peut se faire de **4 manières différentes** :

A/ Le confinement en organelles

L'évolution a regroupé les fonctions ayant un lien avec le dioxygène au sein de la **mitochondrie** et du **peroxysome**.

La mitochondrie possède des cyclo-oxygénase et certaines oxydases. Son statut avec l'oxygène entraîne une forte sensibilité de l'ADN mitochondrial aux mutations.

Les peroxysomes quant à eux contiennent de nombreuses oxydases mais aussi des catalases et peroxydases qui serviront à la détoxification en formant du peroxyde d'hydrogène.

B/ Les systèmes de protection non spécifiques

Ils peuvent prendre la forme des systèmes de **réparation des lipides oxydés**, de l'**excision de bases oxydées** et la **réparation de protéines oxydées** (ces systèmes sont non spécifiques aux radicaux libres).

Ils agissent comme des « épurateurs » de ROS. On trouve parmi eux les alcools et aldéhydes, le glucose, l'acide urique, l'hème, la bilirubine et le bicarbonate.

C/ Les systèmes de protection spécifiques

Ce sont des systèmes permettant l'aérobiose grâce à des **vitamines (C et E) anti-oxydantes**, des **enzymes destructrices de ROS** (les enzymes SOD = superoxide dismutase, et peroxydases, catalases) et le **système glutathion**.

Parmi ces molécules anti-oxydantes on trouve :

-Au niveau membranaire des éléments lipophiles comme la vitamine A (β carotène), la vitamine E (α -tocophérol) et le cholestérol

-En solution des éléments hydrophiles comme la vitamine C (acide ascorbique), le glutathion réduit (souvent en association avec les peroxydases), le glucose, l'acide urique, l'hème ou encore la bilirubine.

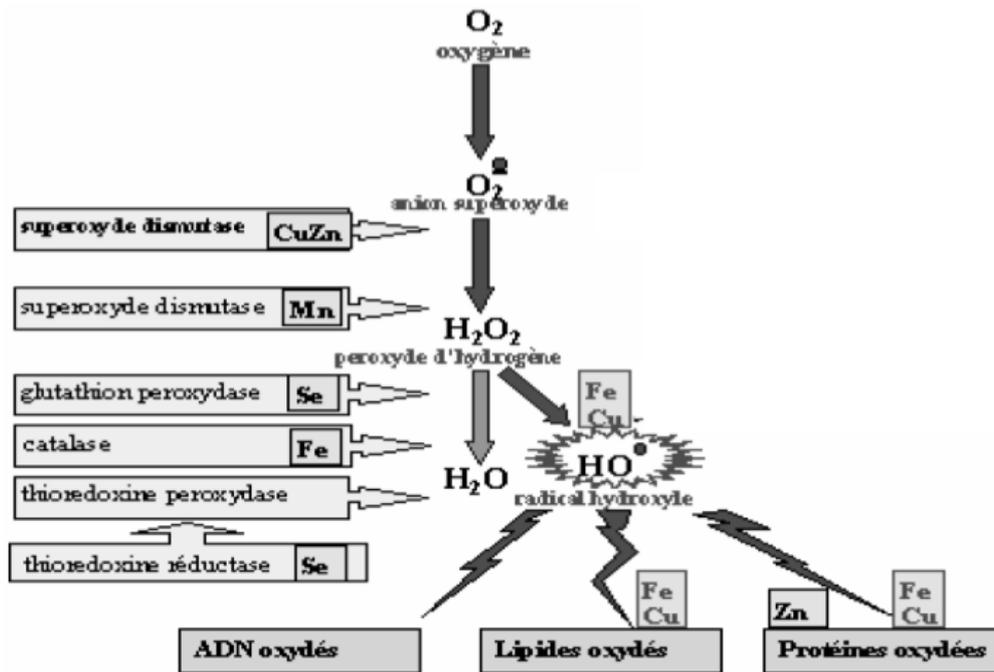
(Le prof a encore passé plein de diapos qu'il laisse « aux chimistes » car contenant les formules des molécules précédemment citées)

D/ Le système glutathion

C'est un tripeptide indispensable formé à partir de glutamate, cystéine et de glycine. Il possède un groupement SH libre sous sa forme réduite. Lorsqu'il est oxydé il s'allie avec un autre glutathion oxydé par un pont disulfure. Actif uniquement **sous forme réduite**, il est indispensable d'avoir la glutathion réductase (et son co-enzyme le NADPH) pour permettre le **maintien normal de la cellule**.

(à venir, la deuxième question que le prof souhaite poser lors du partiel, donc à votre mémoire!)

E/ Le rôle des oligoéléments dans le mécanisme anti-radicalaire



Les **oligoéléments** sont indispensables aux différentes réactions et spécifiques aux enzymes qui catalysent ces réactions :

-le passage de l'anion superoxyde au peroxyde d'hydrogène fait intervenir les **SOD**, qui fonctionnent avec du **cuivre**, **zinc** et **manganèse**.

-le passage du peroxyde d'hydrogène en eau fait intervenir le **glutathion peroxydase** qui fonctionne avec le **sélénium**, la **catalase** avec le **fer** et la **thioredoxine réductase** (équivalent du glutathion peroxydase dans d'autres tissus) avec le **sélénium**.

Si ces enzymes, ces mécanismes, sont défectueux le peroxyde d'hydrogène réagira, produira le radical hydroxyle et aura des effets délétères sur la cellule.

Ces enzymes de détoxification fonctionnent avec des ions métalliques d'où l'importance chez le sujet âgé et des enfants jeunes de oligo-éléments.

Questions :

-Transformation par voie enzymatique et le rôle des oligo-éléments dans les mécanismes anti-radicalaires ?

Éléments de réponse : cuivre, zinc et magnésium indispensables pour les superoxydes. Sélénium pour les peroxydases, catalases. Sans oublier les enzymes avec du fer.

-Savoir le tableau de fin de première partie avec la cascade des ROS : La synthèse et formation des ROS (SOD, Fenton), leur origine physiologique ?

Éléments de réponse : Tous dérivent les uns des autres et il existe une spécificité de tissu. Il faudra bien citer les 6 moyens d'obtenir du superoxyde.