

Département des Sciences Biologiques

Module : Biochimie et pathologie radicalaires

M1 Biochimie

Année Universitaire : 2019-2020

Responsable du module : Dr. Y. Bellik

Chapitres : I. Les radicaux libres : ROS et RNS ; Définition, Formation.

II. Sources des radicaux libres

I. Les radicaux libres : ROS et RNS ; Définition, Formation.

1. Introduction

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.*

L'absence de l'oxygène, 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 et la peau sont détruits beaucoup plus tard.

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

Au fait, l'oxygène est nécessaire pour le transfert d'électrons couplé aux phosphorylations oxydatives qui sont la principale source d'énergie de l'organisme. Cette molécule diatomique (O_2) joue un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie comme accepteur terminal d'électrons. Cependant, l'oxygène possède un caractère toxique pour les organismes et son utilisation requiert des mécanismes protecteurs face à son pouvoir oxydant.

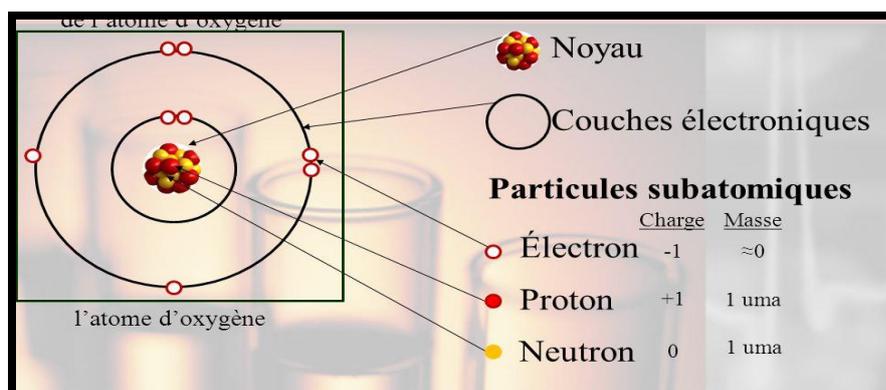




Figure 1. Représentation selon Lewis de l'atome d'oxygène et de la molécule d'O₂ résultant de la mise en commun de deux atomes.

Le cas de l'oxygène est très particulier : la couche de Lewis est incomplète (structure "open shell" : enveloppe ouverte). La molécule d'O₂ est donc paramagnétique, l'oxygène moléculaire possède 12 électrons dans sa couche externe, nombre pair ; son paramagnétisme indique la présence d'électrons non appariés; ceux-ci doivent donc être au nombre de deux.

Théoriquement, chaque atome d'oxygène peut donc accepter 2 électrons pour stabiliser sa "couronne" : la molécule diatomique O₂ possède 12 électrons et peut encore accepter 4 électrons pour être stable (cas de l'eau) : elle est donc très oxydante.

En appliquant le *principe de Pauli* (on ne peut compter au maximum que 2 électrons dans une orbitale), les électrons sont groupés par paires (électrons appariés).

2. Les radicaux libres

2.1. Définition

Un radical libre est une molécule dont un ou plusieurs électrons sont célibataires sur l'orbitale externe d'un ou plusieurs de ses atomes [°]. 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.

2.2. Principaux radicaux libres

Les Espèces réactives oxygénées (ROS : reactive oxygen species) et les Espèces réactives azotées (RNS : reactive nitrogen species) sont les termes décrivant collectivement les radicaux libres. Les tableaux 1 et 2 regroupent les principales espèces radicalaires et non radicalaires. Les espèces oxygénées et azotées non radicalaires exhibent également une action oxydante et peuvent être facilement converties en espèces radicalaires.

Tableau 1: Espèces réactives oxygénées .

Radicaux		Non radicaux	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Peroxyde	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	d'hydrogène	$HOCl^a$
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Acide hypochloreux	O_3
Radical alcoxyle	RO^{\cdot}	Ozone	1O_2
Hydroperoxyde	HOO^{\cdot}	Oxygène singulet	$ONOO^{\cdot b}$
		Peroxynitrite	

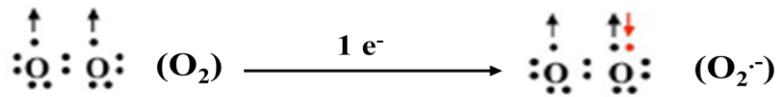
a et b peuvent être également appelés respectivement « espèce réactive chlorée » et « espèce réactive azotée ».

Tableau 2: Espèces réactives azotées.

Radicaux		Non radicaux	
Radical oxyde nitrique	NO·	Acide nitreux	HNO ₂
Dioxyde d'azote	NOO·	Tetroxyde de diazote	N ₂ O ₄
		Peroxynitrite	ONOO·
		Alkyl peroxynitrite	ROONO
		Cation nitrosyle	NO ⁺
		Trioxyle de diazote	N ₂ O ₃
		Ion nitronium(nitryl)	NOO ⁺
		Acide peroxynitreux	ONOOH
		Anion nitrosyle	NO ⁻
		Chlorure nitrique	NO ₂ Cl

2.2.1. L'anion superoxyde (O₂^{•-})

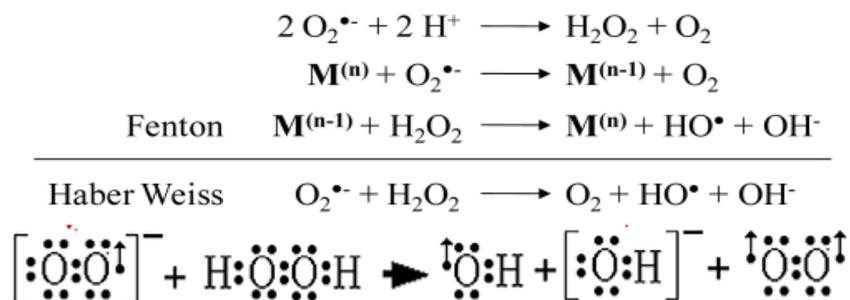
L'anion superoxyde est une espèce réactive oxygénée formée par la capture d'un électron par la molécule d'oxygène.



Il a une faible réactivité avec les composés biologiques et ne réagit ni avec les acides nucléiques, ni avec les protéines, ni avec les lipides et leurs acides gras. Par contre, il a une demi-vie relativement longue (supérieure à quelques dizaines de secondes) ; il peut donc diffuser vers leurs cibles, en particulier les superoxyde dismutases, les ions Fe²⁺, ou encore la vitamine C. *Toutefois, la présence de la charge électrique négative sur cette molécule bloque leur diffusion au travers des membranes biologiques.*

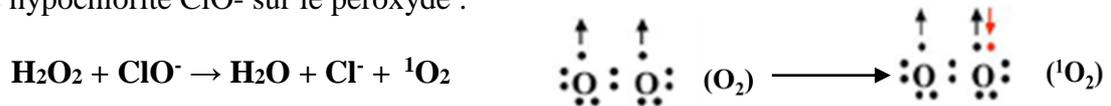
Il est indirectement toxique en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le monoxyde d'azote (NO), produisant respectivement des radicaux hydroxyles ((HO•) et des peroxy-nitrites (ONOO⁻).

En plus de la dismutation spontanée des anions superoxydes, ils donnent le peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton et d'Haber-Weiss :



2.2.2. L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

L'oxygène singulet est un état excité de la molécule de dioxygène. Il se forme par photoexcitation ou pendant la réaction de l'eau oxygénée dans l'eau de Javel par action des ions hypochlorite ClO^- sur le peroxyde :



L'oxygène singulet se caractérise par une configuration électronique particulière dans laquelle deux électrons de spins opposés ($\uparrow\downarrow$) se trouvent sur une orbitale antiliante, alors que le dioxygène triplet — forme habituelle de l'oxygène — correspond à deux électrons de même spin ($\uparrow\uparrow$) répartis entre deux orbitales.

L'énergie d'excitation de l'oxygène singulet par rapport à l'oxygène triplet est de l'ordre de $94,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, correspondant à une relaxation à $1\,268 \text{ nm}$, dans le proche infrarouge.

2.2.3. Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$)

Le radical hydroxyle correspond à la forme neutre de l'ion hydroxyde (OH^-). Le radical hydroxyle présente une demi-vie in vivo très courte d'environ 10 à 9 secondes et une réactivité élevée.

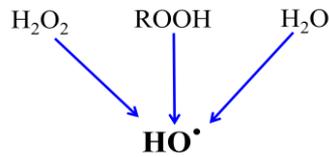


Le radical hydroxyle peut endommager pratiquement tous les types de macromolécules: glucides (glycation), acides nucléiques (mutations), lipides (peroxydation lipidique) et acides aminés (carbonylation).

Contrairement au superoxyde, qui peut être détoxifié par la superoxyde dismutase, le radical hydroxyle ne peut pas être éliminé par une réaction enzymatique. Des mécanismes pour éliminer les radicaux peroxyde pour la protection des structures cellulaires comprennent des antioxydants

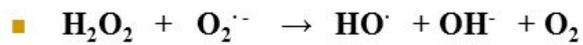
endogènes tels que la mélatonine et le glutathion, et des antioxydants alimentaires tels que le mannitol et la vitamine E.

Production du radical hydroxyle (HO•)

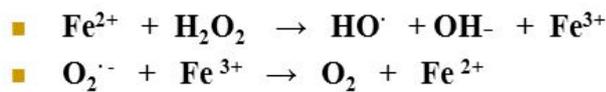


1. Les radicaux hydroxyle sont produits à partir du H₂O₂.

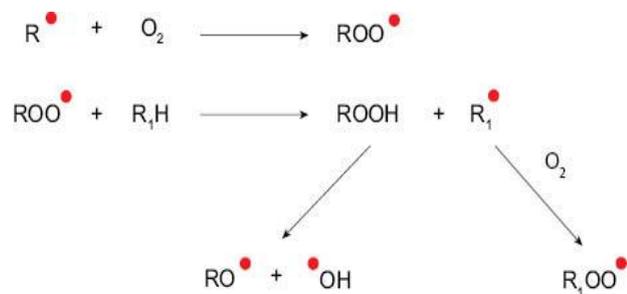
Haber-Weiss reaction:



Fenton reaction:

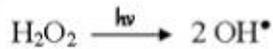


2. décomposition des hydro-peroxydes (ROOH)



3. Dissociation UV-lumière de H₂O₂

•OH generated by direct photolysis of H₂O₂



H₂O₂ in ionised form (HO₂⁻) decomposes to generate •OH



O^{•-} with water can produce another •OH



4. Dissociation de l'eau :

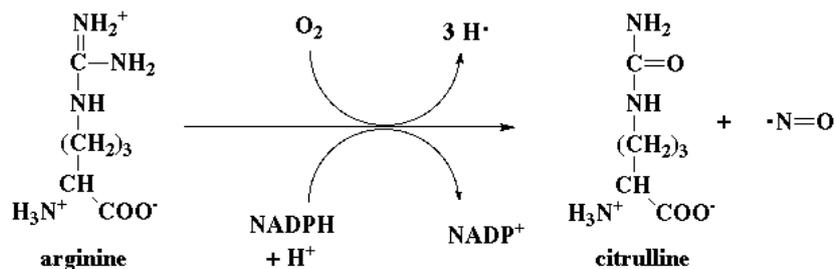


2.2.3. Le monoxyde d'azote (NO•)

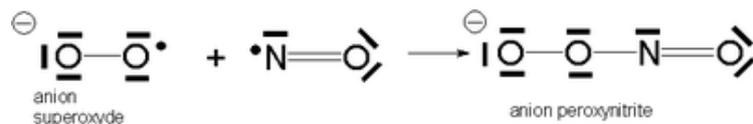
Le monoxyde d'azote, oxyde azotique, oxyde nitrique ou NO est un gaz dans les conditions normales de température et de pression. Sa grande réactivité vis-à-vis des composés radicalaires comme l'oxygène moléculaire - qui est un biradical - ou l'anion superoxyde est due au fait qu'il est lui-même un composé radicalaire - son spin électronique total vaut 1/2.

En milieu biologique, son temps de demi-vie est estimé entre 1 et 5 secondes, voire 30 secondes.

Production



Les peroxyntrites obtenus sont de puissants agents oxydants et nitrants :

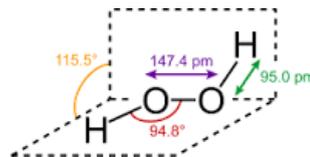


Rôles du monoxyde d'azote

- **Vasodilatateur** (l'endothélium des vaisseaux sanguins)
- **Microbicide** (les macrophages)
- **Neurotransmetteur** (les cellules nerveuses)
- **Relaxant des muscles lisses** (l'appareil gastro-intestinal)
- **Régulateur de l'apoptose**

2.2.5. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce oxygénée réactive non-radicalaire et est l'intermédiaire le plus stable dans la réduction des 4 électrons de l'oxygène de l'eau. Le H₂O₂ est non chargé, et il passe facilement à travers la membrane cellulaire, par diffusion, une fois à l'intérieur il peut réagir avec les métaux de transition libérant des radicaux hydroxyles (OH·) par la réaction de Fenton ou d'Haber-Weiss



II. Sources des radicaux libres

La production de radicaux libres peut être d'origine endogène ou exogène ou résulter d'activités enzymatiques ou non enzymatiques (Fig. 1).

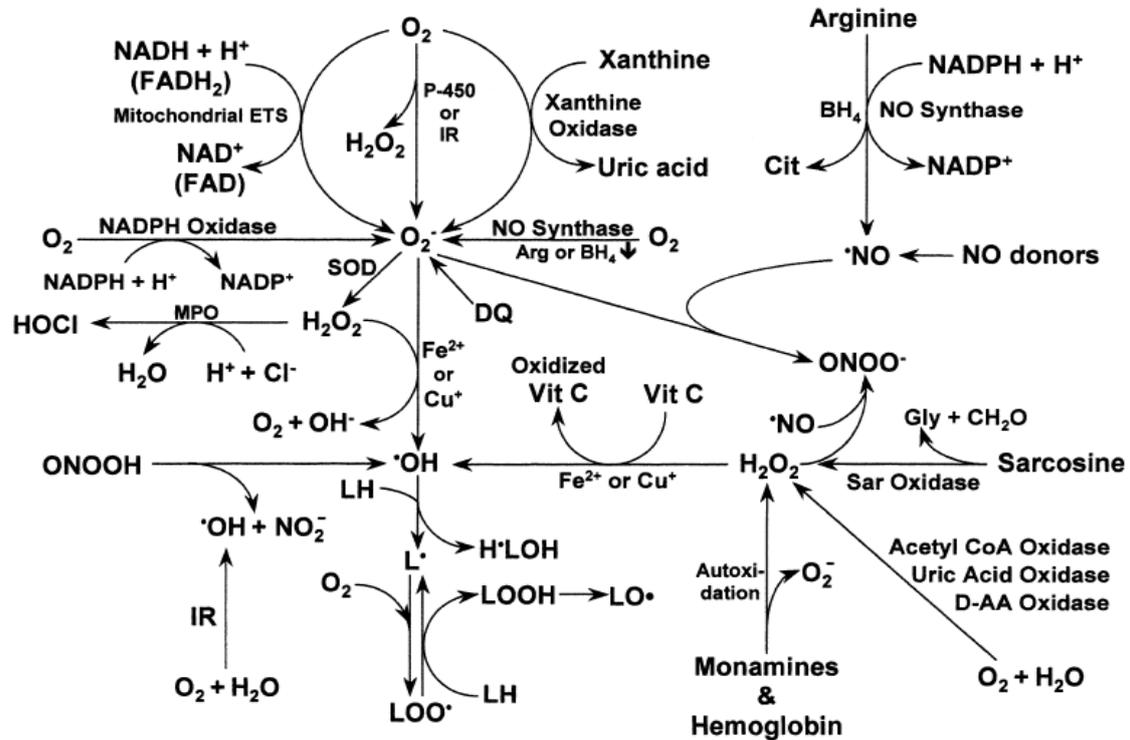


Figure 1 :Productions des radicaux libres oxygénés (ROS) et azotés (RNS) et autres espèces réactives dans les cellules de mammifères.

AA: amino acid, Arg: L-arginine, BH₄: (6R)-5,6,7,8,-tetrahydro-L-biopterin, CH₂O: formaldéhyde, Cit: L-citrulline, DQ: diquat, ETS: electron transport system, FAD: flavin adenine dinucleotide (oxidized), FADH₂: flavin adenine dinucleotide (reduced), Gly: glycine, H₂O₂: hydrogen peroxide, HOCl: hypochlorous acid, H•LOH: hydroxy lipid radical, IR: ionizing radiation, L•: lipid radical, LH: lipid (unsaturated fatty acid), LO•: lipid alkoxy radical, LOO•: lipid peroxy radical, LOOH: lipid hydroperoxide, MPO: myeloperoxidase, NAD⁺: nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized), NADH: nicotinamide adenine dinucleotide (reduced), NADP⁺, nicotinamideadenine dinucleotide phosphate (oxidized), NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced), •NO: nitric oxide, O₂^{-•}: superoxide anion radical, •OH: hydroxyl radical, ONOO⁻, peroxyntirite, P-450: cytochrome P-45, PDG: phosphate-dependent glutaminase, Sar: Sarcosine, SOD: superoxidodismutase, Vit C: vitamin C, Vit E: vitamin E (α-tocopherol).

2.3.1. Sources exogènes

- Rayonnement électromagnétique (radioactivité, radiations ionisantes, lumière ultraviolette : UVA et UVB).
- Métaux toxiques : Cadmium, plomb, mercure.
- Fumées de combustion (cigarette, bois, matériaux de construction), oxyde de carbone.
- Produits chimiques (intervention du cytochrome P450) : antiseptiques, médicaments, pesticides.
- Solvants (benzène), détergents, trichloréthylène.
- Poussières (d'amiante, de silice).
- Alcool.

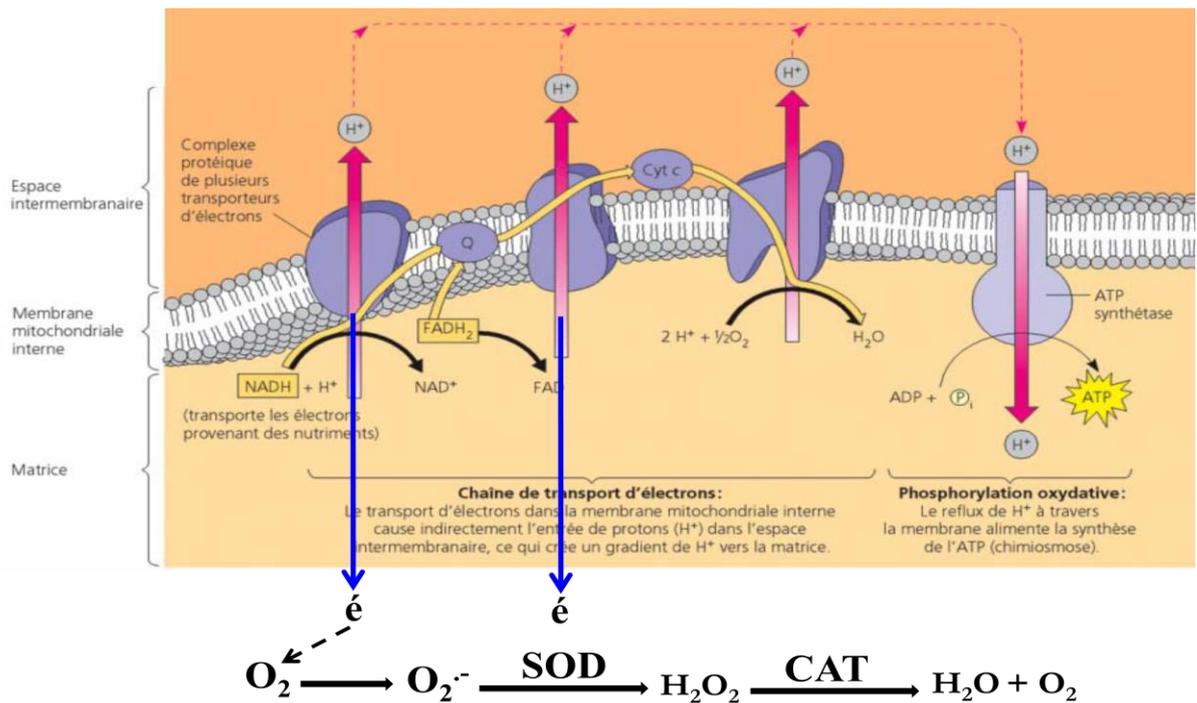
2.3.2. Sources endogènes

La chaîne mitochondriale de transport d'électrons, la NADPH oxydase et la xanthine oxydase sont les principales sources de la production d'oxydants dans l'organisme.

2.3.2.1. Chaîne mitochondriale de transport d'électrons

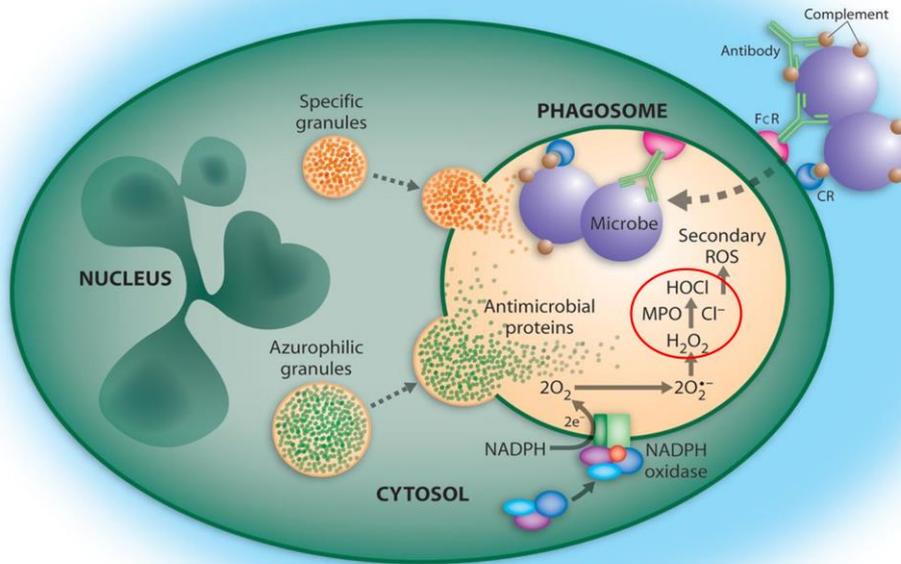
La réduction tétravalente de l'O₂ moléculaire par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons est nécessaire à la production de l'énergie biologique. Pour qu'elle se réalise, quatre complexes mitochondriaux (I-IV) sont impliqués. Cependant la réduction reste incomplète; 1% à 4% d'oxygène fuit la chaîne de transport d'électrons sous la forme d'O₂^{•-}. Ce dernier est produit au niveau du complexe I et du complexe III, et la majeure partie de l'O₂^{•-} est converti par la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) dans la matrice mitochondriale en H₂O₂ qui diffuse facilement à travers les membranes mitochondriales. Le reste quitte la mitochondrie via les canaux anioniques de la membrane mitochondriale et est rapidement converti en H₂O₂ dans le cytoplasme, soit spontanément, soit par la superoxyde dismutase à cuivre (CuSOD). Le H₂O₂ est réduit en H₂O

et en O_2 par la catalase et la glutathion peroxydase. Par ailleurs, le H_2O_2 réagit avec les métaux de transition particulièrement Fe^{2+} (réaction de Fenton) pour former le radical hydroxyle ($OH\cdot$).

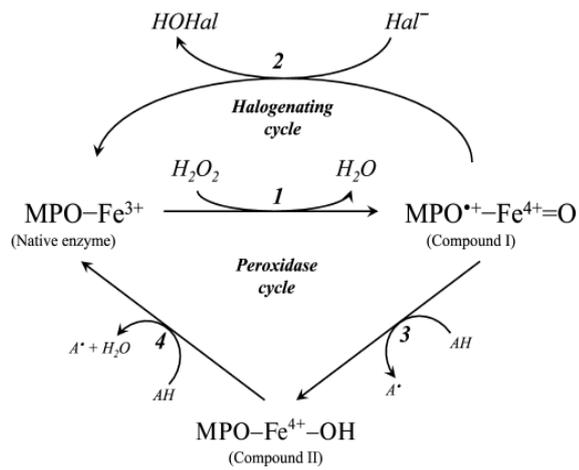


2.3.2.2. Cellules immunitaires

Les macrophages et neutrophiles activées, peuvent produire de grandes quantités d' $O_2^{\cdot -}$ et de ses dérivés via les isoformes de la NADPH oxydase phagocytaire. La production massive des ROS antimicrobiennes et antitumorales dans un environnement inflammatoire est appelée « explosion oxydative » et joue un rôle important de première ligne de défense contre les agents pathogènes. De plus, les activités combinées de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase des cellules phagocytaires mènent à la production de l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'un des plus forts oxydants physiologiques et puissant agent antimicrobien. La stimulation des neutrophiles et des macrophages génère également l'oxygène singulet par des réactions qui impliquent soit la myéloperoxydase soit la NADPH oxydase.



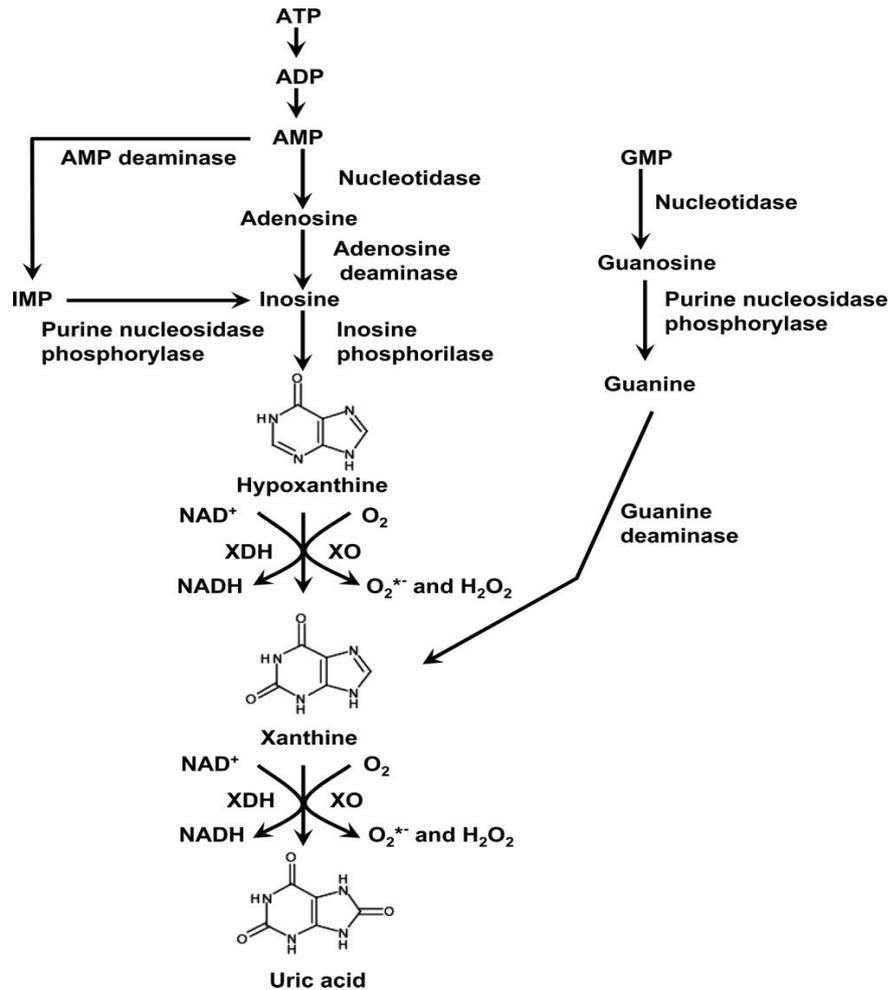
Le complément et les récepteurs d'anticorps (CR et FcR) favorisent l'absorption de microorganismes par les neutrophiles, ce qui déclenche la dégranulation et la production de ROS.



2.3.2.3. Xanthine oxydase

L'enzyme dérive de la xanthine déshydrogénase par un clivage protéolytique. La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique en réduisant O_2 en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 .

La production des ROS par la xanthine oxydase est considérée comme la principale source du stress oxydant dans certaines conditions pathologiques telle que l'ischémie/reperfusion.



Par ailleurs, l'activité de certaines enzymes participe également à la production des radicaux libres, on trouve principalement les familles d'enzymes comme : cytochrome P-450 et cytochrome b5 (réticulum endoplasmique), cytochromes oxydases et systèmes de transport d'électrons (membranes nucléaires), glycolate oxydase, D-amino acide oxydase, urate oxydase, L-hydroxyacide oxydase, et acyl-CoA oxydase (Peroxysomes), myéloperoxydase, nitrique oxyde synthase, lipooxygénase et cyclooxygénase.

L'autooxydation de certaines molécules telles que la dopamine, épinéphrine, flavines et hydroquinones peut constituer une importante source cellulaire de la production de ROS.