

Le stress oxydant

Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique

Alain Favier

Abstract

The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches

Free radicals and their precursors are members of a reactive chemical family named reactive oxygen species. Living beings use their beneficial reactivity in a lot of processes, as weapon in defence mechanisms or as signal inside or inter cells. So a useful level of beneficial reactive species is maintained inside cell by an equilibrium between the generating system producing free radicals such as mitochondrial respiration, phagocytosis, redox cycle or radiations, and the antioxidant systems such as scavenger molecules absorbed from the diet (vitamin C, E, carotenoids, polyphenols) or produced endogenously (glutathione, thioredoxin) or such as antioxidant enzymes (superoxide dismutases, glutathione peroxidases). Unfortunately an oxidative stress may occur, resulting from a disequilibrium between prooxidant sources of radicals and antioxidant systems. Oxidative stress will damage intracellular macromolecules, oxidizing lipids, DNA or proteins. Many cellular dysfunctions result from these biochemical damages, variable according to the level of stress: excess in cell proliferation, cell death by apoptosis, lipid deposition, mutagenesis. By creating such disorders, oxidative stress is partly responsible from a great number of age-related diseases as cancer, cardiovascular disorders, neurodegenerative diseases as Alzheimer disease. So many therapeutical strategies have been tested in animal and human to prevent the occurrence of these oxidative diseases. They use nutritional improvement of antioxidant capacities, plant or chemical antioxidants. Chemists designed various new molecules chelating iron, scavenging free radicals or catalysing destruction by miming the activity of antioxidant enzymes. But new ways of research have to be now explored to create more specific and tissue targeted molecules able to regulate the intracellular level and not only to destroy oxygen radicals.

Mots-clés

Antioxydant, stress oxydant, radicaux libres, maladies.

Key-words

Antioxidant, stress, free radicals, diseases.

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines. Qu'en est-il exactement ? Est-ce une mode ou une réalité, et dans ce cas, pouvons-nous trouver de nouvelles armes médicamenteuses pour lutter contre ce phénomène ?

Origine du stress oxydant

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit

que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ».

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à

Glossaire

Adduit

Fixation d'une molécule sur une des bases de l'ADN par une liaison covalente pouvant parfois former un pont intra-caténaire entre les deux chaînes de l'ADN.

Cytosol

Liquide contenu à l'intérieur des cellules.

Facteur de transcription

Protéine permettant la lecture d'un gène lorsqu'elle se fixe sur son promoteur.

Radical libre

Espèce chimique possédant un électron non apparié.

Régulon

Chez les bactéries, ensemble contigu de gènes codant pour des protéines et de gènes codant pour des protéines régulatrices.

Sites abasiques

Partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.

Xénobiotique

Molécule étrangère, susceptible de pénétrer dans le corps humain.

une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, dans l'irradiation, dans les ischémies/reperfusions suivant des thromboses. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation française. Enfin, la mauvaise adaptation peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion), soit régénérant un antioxydant, soit couplant la défense à l'énergie (comme la G6PD), soit d'un promoteur de ces mêmes gènes que la mutation rendra incapable de réagir à un excès de radicaux. Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme.

Les radicaux libres de la biologie

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} [1]. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène** (figure 1).

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) comme le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) ou surtout le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques ; au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la **respiration mitochondriale** dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du

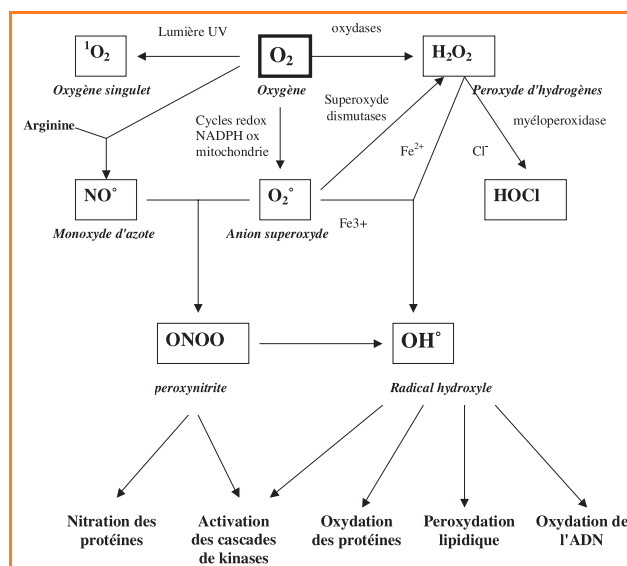


Figure 1 - Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, production que l'on peut comparer aux inévitables déchets des centrales industrielles d'énergie. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires (effet du $TNF\ \alpha$) ou nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmentent avec l'âge.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les **cellules phagocytaires activées** qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de NO^{\bullet} et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxyde d'azote.

Des sources importantes de radicaux libres sont les **mécanismes de cycles redox** que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit aussi avec des composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines. Les **métaux** toxiques (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existants lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 , par une réaction appelée **réaction de**

Fenton. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Les **rayonnements** sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet.

Un paradoxe : les radicaux libres sont-ils indispensables à la vie ?

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes.

La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène si brutale et intense qu'elle est connue, depuis les travaux de Baldrige sur le polynucléaire en 1933, sous le nom de « burst oxydatif », c'est-à-dire explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action des superoxydes dismutases (SOD) et NOS aboutissent à un mélange très corrosif de O_2^{\bullet} , H_2O_2 , HO^{\bullet} , $ONOOH$, avec en plus dans le polynucléaire $HOCl$ et 1O_2 . Ce mélange réactionnel, que l'Homme a imité en utilisant comme désinfectant l'eau de javel ou l'eau oxygénée, détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens.

Les radicaux libres constituent aussi un système de transmission de signaux, sans doute apparu très tôt dans l'évolution de la vie. Ce système est présent dans les êtres unicellulaires qui réagissent à l'oxygène du milieu ambiant en adaptant leurs systèmes de défense, et il s'est conservé chez les êtres évolués, y compris les mammifères, qui se sont dotés de systèmes cellulaires de production de radicaux libres et de systèmes de détection et de transduction du signal. Les radicaux oxygénés peuvent donc être considérés comme des messagers intra et extracellulaires. Ils permettent d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress, thermiques, ultraviolets, xénobiotiques, permettant l'expression de gènes de défense. Chez les bactéries, les gènes de défense contre le stress oxydant sont organisés en régulon : un gène exprime un premier facteur de transcription qui, après activation par un dérivé oxygéné, va activer le gène d'un deuxième facteur de transcription ubiquitaire pour un ensemble de systèmes antioxydants. Ainsi, il existe plusieurs ensembles de gènes mis en jeu lors des stress oxydants chez *E. coli* : le régulon *oxyR-oxyS* dont l'expression aboutit à la synthèse de 9 protéines en une vingtaine de minutes après activation par H_2O_2 , le régulon *soxR-soxS* dont l'expression aboutit à la synthèse de nombreuses enzymes antioxydants (la

SOD-Mn, l'endonucléase IV, la glucose 6 phosphate déshydrogénase qui fournira le NADPH nécessaire à la glutathion réductase, une paraquat réductase qui paradoxalement produit O_2^{\bullet} , la protéine ribosomiale S6, et la porine membranaire OmpF).

Chez l'Homme, les gènes antioxydants les plus inductibles par un stress oxydant sont ceux de la superoxyde dismutase à manganèse, de la catalase, de la ferritine, de l'hème oxygénase, de la γ glutamyl-cystéine synthase, de la iNO synthase, de la thioredoxine, de l'HSP 70, des métallothionéines, alors que ceux de la superoxyde dismutase Cu-Zn et de la glutathion peroxydase sont peu inductibles [2]. Cette inductibilité des gènes antioxydants explique le phénomène d'adaptation au stress oxydant des cellules et des animaux qui exposés régulièrement à de faibles doses deviennent résistants à de fortes doses de radicaux oxygénés. Mais les espèces actives de l'oxygène peuvent aussi activer des gènes de fonctions cellulaires autres que ceux de la lutte contre les radicaux libres, ceci par l'intermédiaire de facteurs redox sensibles comme AP1, HIF-1 ou NF-KB [3]. Ainsi, les gènes des cytokines TNF, IL1, IL6, de la lipoprotéine lipase, de la collagénase, de l'aldose réductase, des oncogènes c-jun et c-fos, de GADD153, de p21(waf1/cip1), de ELAM 1 et ICAM 1, de la tyrosine protéine phosphatase, de la β actine ou de l'ornithine décarboxylase sont activés par les espèces oxygénées, alors que ceux de la PEPCK et de l'activateur du plasminogène sont inversement inhibés par les espèces actives de l'oxygène.

Les radicaux libres peuvent aussi servir de relais physiologiques entre cellules différentes, dans la stimulation de certains récepteurs membranaires et régulent de nombreuses fonctions comme la vasodilatation des vaisseaux, la prolifération cellulaire. Dans des circonstances dramatiques, ils seront des signaux de mort cellulaire lorsque les capacités de réparation seront dépassées. L'effet du stress oxydant sur la transduction du signal a déjà fait l'objet de plusieurs revues montrant que ce concept est désormais accepté en nutrition, immunologie, diabétologie ou cancérologie [4]. Les radicaux oxygénés pourraient même être les premiers responsables de l'activation des kinases en cas de réponse à des agressions comme l'irradiation, les cytokines inflammatoires ou les carcinogènes chimiques.

Ayant besoin d'une certaine quantité d'espèces réactives de l'oxygène, l'organisme ne cherche donc pas à les détruire mais à contrôler leur niveau pour éviter le stress oxydant. Ceci explique la régulation très fine du génome antioxydant et de ses mécanismes d'adaptation. La thérapie antioxydante ne doit pas oublier ces activités utiles des radicaux libres sous peine d'échec, voir d'effets toxiques paradoxaux, tel l'effet procarcinogène observé dans certaines études de supplémentation par des doses très élevées de β carotène.

Le contrôle des radicaux libres par la cellule

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables [5]. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est

elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases [6]. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates [7]. Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO^\bullet . D'autres composés endogènes jouent un rôle sans doute important mais encore mal évalué : les thioredoxines, les glutaredoxines, les métallothionéines, l'acide lipoïque ou les polyamines. La plupart des composés biologiques réagissant avec (donc piégeant) le radical hydroxyle, il conviendra de réserver le terme d'antioxydant à des composés dont la teneur dans les tissus diminue lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques.

L'autre stratégie utilisée est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et peroxydes. Ainsi, les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde [8]. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD). Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium [9]. Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPX) dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx). Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules (figure 2). Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites ci-dessus, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante. La production d'énergie ne semble pas ici en elle-même capitale (la diminution de l'ATP facilitant même la formation du NADPH).

Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de

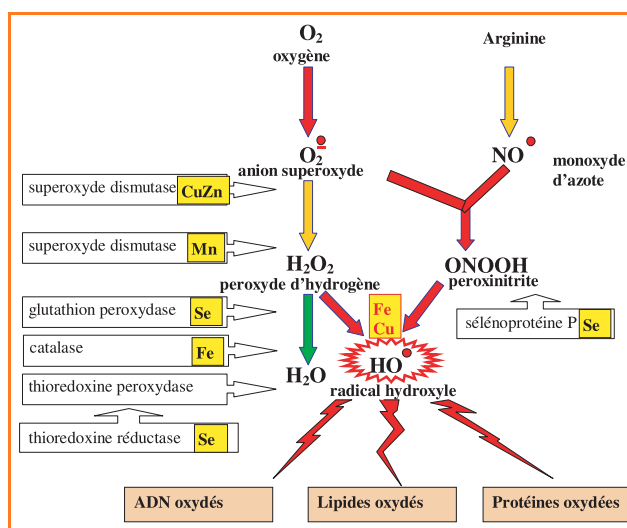


Figure 2 - Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.

l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique.

Conséquences biochimiques

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée **peroxydation lipidique** forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué [10]. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui, de par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal. La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes (figure 3). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au bas mot, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par

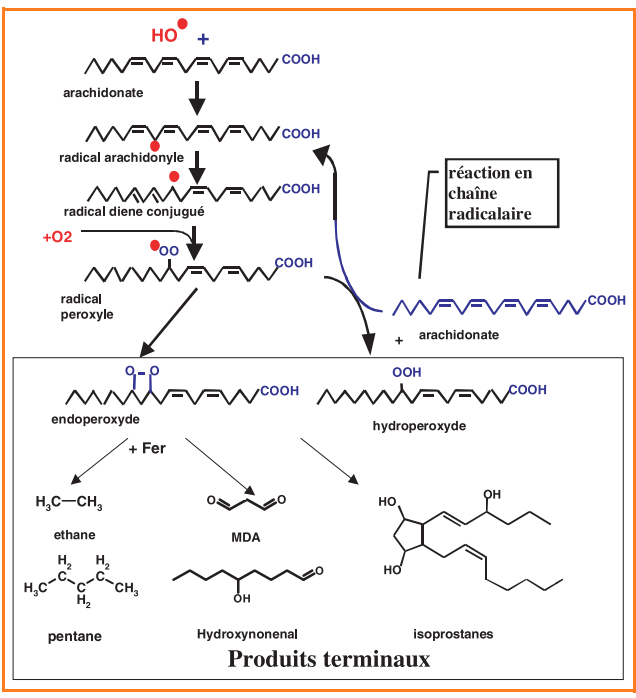


Figure 3 - Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

OH[•] peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines [11]. Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine, 8 oxo adénine, formimido uracile, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone. Un très grand nombre de ces composés et de leurs mécanismes de formation ont été identifiés dans notre laboratoire. Mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), entraîne des pontages des protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine. Le rôle des nombreux métaux fixés à l'ADN, qui est un polyanion (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd...), est crucial pour amplifier ou orienter le profil de ces lésions. Cette attaque de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule est estimé à 10⁴. Heureusement, la fidélité de la séquence des 4.10⁹ paires de bases de notre ADN cellulaire est maintenue depuis des milliers d'années et dans des milliards de cellules grâce à des systèmes de réparation perfectionnés, dont les principaux sont la réparation par excision de base (BER) ou par excision de nucléotide (NER), couplées ou non à la transcription, le système de réparation des misappariements et la réparation par recombinaison (figure 4). Malheureusement, ce beau mécanisme peut se dérégler soit par une surcharge de lésions en cas de stress

massif, soit par un mauvais fonctionnement de ces systèmes de réparation chez des sujets déficients en cofacteurs (thio-redoxines, zinc) ou atteints d'une anomalie génétique. Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérases translésionnelles infidèles aboutissant à une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par un mécanisme appelé apoptose. *In fine*, cette modification de l'ADN induit des mutations par transversions GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. Ces sont les premières étapes de la carcinogenèse et ce n'est pas une coïncidence si les agents carcinogènes sont tous des générateurs puissants de radicaux libres (radiations ionisantes et UV, fumée, alcool, fibres d'amiante, métaux carcinogènes, hydrocarbures polycycliques).

Si la chimie de l'attaque radicalaire des **polysaccharides** a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH[•], qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE.

Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine.

Les **protéines** les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques

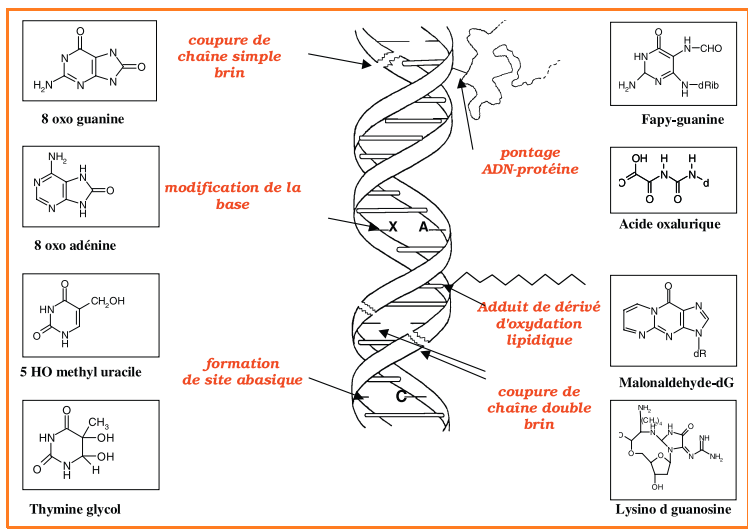


Figure 4 - Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

(enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés.

Les **conséquences biologiques du stress oxydant** seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression.

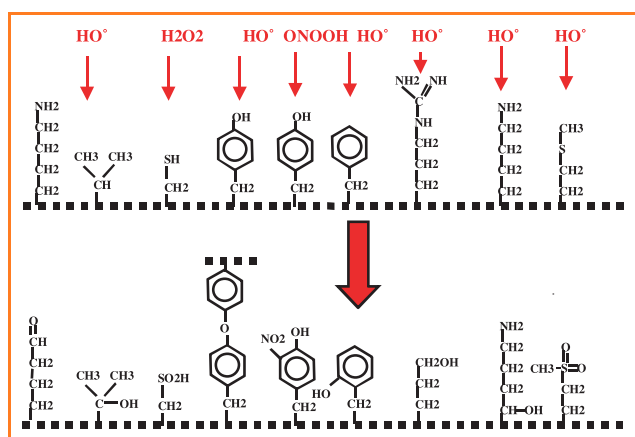


Figure 5 - Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.

Comment mettre en évidence un stress oxydant chez un malade ?

Un grand nombre de techniques actuellement utilisables pour évaluer le stress oxydant ont fait l'objet d'ouvrages ou de revues [12]. Toutefois, ce domaine de la biologie n'a pas encore été étudié avec la rigueur et le souci de standardisation et d'optimisation des méthodes, habituels en biologie clinique. Une grande disparité de techniques et de résultats complique donc l'interprétation des résultats et alimente polémique et désarroi de celui qui est désireux d'aborder ces techniques. Par ailleurs, il existe des difficultés inhérentes à cette exploration, liées à la rapide fugacité des espèces radicalaires, à l'oxydabilité des paramètres redox, ainsi qu'à la localisation de ce stress dans un type donné et d'un nombre réduit de cellules dans un tissu sain.

L'exploration du statut radicalaire peut se faire par trois abords : la mesure de la production de radicaux (statut prooxydant), la mesure des capacités de défenses (statut antioxydant) et la mesure de l'étendue des désordres biochimiques spécifiques résultant d'un déséquilibre entre la balance antioxydants/prooxydants.

Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux [13].

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme p53.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [14]. Dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses. Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition des autres facteurs athérogènes : augmentation de la résistance à l'insuline, activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (prostacycline, cytokine, facteur de fibrinolyse, superoxyde, NO), augmentation de la prolifération des fibres lisses. Un facteur de risque découvert récemment, l'homocystéine, voit son action liée en partie à la génération de radicaux libres au cours de son métabolisme. Les causes essentielles de ce stress oxydant sont soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments, ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), soit d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...), soit d'origine génétique. Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira au mécanisme pathogène.

La responsabilité la plus nette des radicaux libres est mise en évidence dans les maladies directement induites par des anomalies d'un gène antioxydant. Plusieurs mutations de la CuZn superoxyde dismutase ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Le transfert du gène de malade chez la souris recrée d'ailleurs une maladie analogue à la maladie humaine. La dégénérescence maculaire liée à l'âge est fortement associée avec la forme valine/alanine du polymorphisme du gène de la superoxyde dismutase.

Comment lutter contre le stress oxydant ?

Le stress oxydant étant à l'origine de nombreuses maladies, il semble logique de chercher à le supprimer. Toutefois, il faut bien se garder d'être « simpliste » sur un sujet aussi complexe et ambigu. Tout d'abord, le stress oxydant est

souvent à l'origine des premières anomalies responsables de modifications irréversibles de molécules et de cellules, et ces anomalies se produisent plusieurs années avant l'apparition des signes de la maladie qui sont irréversibles. Ainsi dans une maladie auto-immune, les antioxydants ne pourront réverser le phénomène lorsque les lignées de lymphocytes auront été sélectionnées et activées, même si les radicaux libres ont participé à modifier les protéines cellulaires plusieurs années auparavant, pour les rendre antigéniques. On peut envisager sous le titre d'« antioxydants » au sens large, l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces actives de l'oxygène [15]. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion (figure 6).

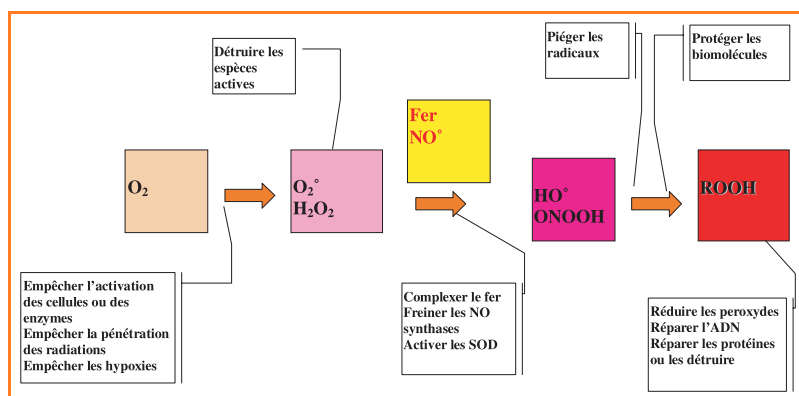


Figure 6 - Stratégie de conception de systèmes antioxydants susceptibles de prévenir la formation de radicaux libres oxygénés ou de permettre leur destruction.

La prévention nutritionnelle

L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants visera donc essentiellement à prévenir ces maladies. Or nous ne savons pas toujours quels sont les antioxydants responsables des effets bénéfiques observés en épidémiologie avec les aliments riches en antioxydants comme les fruits et les légumes. L'alimentation contient un grand nombre d'antioxydants, non seulement les vitamines (E, C, Q, β carotène) et les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse), mais aussi 600 sortes de caroténoïdes, 4 000 polyphénols et flavonoïdes (trouvés dans les choux, le thé, le vin, les céréales, les fruits), des alcaloïdes, des acides organiques, des phytates, des dérivés soufrés de l'ail et de l'oignon, des dérivés indoliques du chou...

En dehors de la prévention primaire, l'apport d'antioxydants pourra être utile pour éviter les récives. Il permettra aussi de stabiliser la tolérance à l'insuline, d'améliorer l'immunité. Enfin, les antioxydants pourront être utilisés pour diminuer la toxicité des médicaments, souvent générateurs de radicaux oxygénés dans leur métabolisme. Toutefois, il faudra se méfier des effets paradoxaux de fortes doses d'antioxydants, car tous deviennent prooxydants s'ils sont administrés en excès. De plus, il ne faut pas supprimer le bruit de fond physiologique des radicaux libres. Nous avons vu leur utilité dans la défense anti-infectieuse. N'oublions pas que l'apoptose est aussi un phénomène utile qui supprime les cellules infectées par des virus ou les cellules cancéreuses.

Dans tous les cas, l'apport d'antioxydants devra se faire dans la limite des apports recommandés et en préférant un

renforcement global des défenses par un apport simultané d'un ensemble d'antioxydants à activité complémentaire, plutôt que l'apport massif d'un seul d'entre eux. Cet apport préventif d'antioxydants nutritionnels a montré ses limites avec plusieurs essais de grande envergure qui se sont avérés négatifs, sans doute à cause d'un apport à des doses excessives de β carotène chez des sujets déjà à fort risque de lésions précancéreuses [16]. Par contre, plusieurs autres études utilisant du sélénium (étude Precise) ou un mélange vitamines C et E et sélénium (étude du Linxian) ont permis une réduction du risque de cancers. Nous venons d'obtenir les résultats d'une étude similaire réalisée en France, l'étude Suvimax. La prise d'un mélange au sein d'une cohorte de 15 000 volontaires a entraîné au bout de 8 ans une réduction de 30 % des cas de cancers chez les sujets masculins, alors que le supplément n'a pas entraîné de bénéfice chez les sujets de sexe féminin. Il faut dire que ces dernières possédaient au début de l'étude un statut antioxydant en β carotène nettement supérieur, dû à leurs meilleures habitudes alimentaires et notamment à une plus grande consommation de fruits et légumes.

Les antioxydants naturels et de synthèse

Les antioxydants non nutritionnels comprennent des produits naturels extraits de plantes, utilisés tels quels ou après modifications chimiques, des produits extraits d'animaux terrestres ou marins (enzymes ou protéines antioxydantes), des produits de synthèse imitant les enzymes, chélatant le fer ou piégeant les radicaux. Ce dernier groupe de piégeurs de radicaux de synthèse comprend d'anciens médicaments utilisés depuis longtemps comme fluidifiants bronchiques, anti-inflammatoires ou anti-hypertenseurs et redécouverts récemment comme étant antioxydants, et de nouvelles molécules dessinées à finalité d'être antioxydantes. Toutefois, les molécules historiques ont l'avantage de posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme médicaments, alors que bien peu de nouvelles molécules ont réussi à obtenir cette coûteuse et difficile autorisation.

Les dérivés végétaux sont extrêmement nombreux à être utilisés principalement dans le domaine des suppléments et des produits cosmétologiques anti-vieillesse, qu'il s'agisse de principes extraits de légumes, d'épices, de fruits ou de plantes médicinales. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celle des polyphénols a donné le plus de molécules. Les plus utilisés sont la quercétine (chef de file des flavonoïdes), le resvératrol, extrait de l'écorce du raisin rouge et la curcumine, extraite de la racine de curcuma.

Les chélateurs du fer ont été très étudiés, mais peu de molécules ont réussi à détrôner la desferrioxamine qui est un sidérophore naturel extrait de la bactérie *Nocardia*. Toutefois, cette molécule doit être administrée par voie parentérale. La Dexrazoxane est un chélateur de cations divalents bidentate qui, en pré-traitement avant la doxorubicine, permet de diminuer l'incidence et la sévérité de la toxicité cardiaque. Toutefois, sa faible durée de vie, comparée à celle du médicament, diminue son efficacité.

L'utilisation des enzymes a été très limitée par leur peu d'efficacité clinique et par le risque de contamination accrue depuis l'apparition de l'encéphalopathie bovine spongiforme. Par contre, les chimistes ont fabriqué un grand

nombre de molécules à propriétés superoxydes dismutases, dits « SOD likes », basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse. Mais pour être efficace *in vivo*, une molécule montrant une activité SOD *in vitro* doit être non toxique, stable, avoir une longue demi-vie, ne pas former de complexes ternaires avec les composants cellulaires, réagir lentement avec l'oxygène moléculaire sous sa forme réduite, être capable de traverser des membranes cellulaires et de gagner un site hydrophile ou lipophile. De même, des dérivés du sélénium présentent des propriétés peroxydasiques. Parmi eux, l'Ebselen [2-phényl-1,2-benzosélenazol-3(2H)-one] est maintenant commercialisé dans de nombreux pays européens comme anti-inflammatoire.

Les piègeurs chimiques appartiennent à de nombreuses familles : dérivés phénoliques (butyl hydroxy toluène, probucol ou 4,4'[(1-méthyléthylidène) bis(thio)]bis-[2,6-bis(1,1-diméthyl) phéno]), dérivés stéroïdiens (lazaroides), dérivés soufrés (N-acétyl cystéine, DMSO, pénicillamine), dérivés de la méthyl xanthine (caféine, théobromine, théophylline, pentoxifylline, allopurinol, trimétazidine), dérivés hydroxylés (mannitol, dipyrimadol).

L'approche biologique

L'utilisation en thérapeutique des enzymes antioxydantes s'est avérée décevante, sans doute parce que la quasi-totalité des essais thérapeutiques ont porté sur la superoxyde dismutase cuivre-zinc cytosolique, enzyme ambiguë quant à son rôle strictement antioxydant puisque sa surexpression fait produire à la cellule du peroxyde d'hydrogène plus dangereux que le superoxyde, car étant neutre, il traverse les membranes et peut générer OH^{*} par la réaction de Fenton. Les enzymes à sélénium comme les protéines soufrées (méthylthionéines, thioredoxines) seraient théoriquement beaucoup plus intéressantes mais doivent être produites en grande quantité par génie génétique et testées chez l'animal. Deux autres approches semblent prometteuses : la thérapie génique et le transfert de protéines ciblées. La thérapie génique par transfert de gènes antioxydants a donné des résultats encourageants chez l'animal : diminution des conséquences de l'ischémie du myocarde par les gènes de la catalase ou des SOD, suppression des métastases de cancer du poumon par le gène de la SOD extracellulaire, suppression des tumeurs gliales par la SOD. Le transfert de protéines taguées permet de les faire pénétrer dans les cellules, grâce à une petite séquence peptidique cationique, le PTD (ou « protein transduction domain »), qui par un récepteur membranaire et de l'énergie, permet à la protéine fusionnée de traverser la membrane plasmique et même la barrière hémato-méningée. Nous avons récemment montré qu'il était ainsi possible de faire entrer des protéines antioxydantes dans des îlots de Langerhans (cellules sécrétant l'insuline au sein du pancréas) et de les protéger des stress oxydants très importants chez le diabétique.

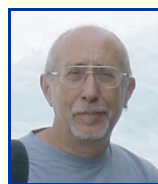
Avenir

Le stress oxydant est devenu une notion incontournable en biologie médicale et porteuse d'espoir thérapeutique, mais une notion plus complexe et plus riche que ce que nous en percevions initialement. De nombreuses lacunes demeurent dans l'arsenal thérapeutique contre le stress oxydant. Nous ne disposons d'antioxydants efficaces et utilisables en médecine que contre les radicaux superoxydes (peu

toxiques) ou hydroxyles (difficiles à atteindre car réagissant instantanément). Il est donc capital de trouver de nouvelles molécules efficaces pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le monoxyde d'azote et surtout le peroxyde nitrite. Toutefois, l'idéal serait d'aboutir à des médicaments ciblés à un tissu et permettant un contrôle de l'état redox des cellules ou la prévention du stress, plutôt qu'à un effet global antioxydant qui ferait perdre à la cellule le bénéfique potentiel qu'elle tire paradoxalement des radicaux libres de l'oxygène. Pour cela, les chimistes pourraient fabriquer des molécules modulant l'expression des gènes antioxydants. L'industrie cosmétologique développe ainsi beaucoup de recherches sur les inducteurs de ces protéines au niveau cutané. Un autre abord est la synthèse de mimétiques d'enzymes autorégulés par le niveau redox de la cellule. Mais l'industrie chimique peut aussi chercher, comme notre organisme, à utiliser les radicaux libres pour activer par voie redox des prodrogues, permettant une action ciblée aux cellules activées produisant ces radicaux, soit pour réduire l'inflammation, soit pour stopper l'infection virale, soit pour déclencher l'apoptose de cellules cancéreuses.

Références

- [1] Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y., Free radicals in chemistry, *Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, **2000**.
- [2] Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A., Regulation of gene expression by reactive oxygen, *Signalling*, **2002**, *14*, p. 879.
- [3] Haddad John J., Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1999**, *39*, p. 67.
- [4] Droge W., Free radicals in the physiological control of cell function, *Cellular Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, p. 47.
- [5] Kinsky N., Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, *7*, p. 617.
- [6] Packer L., Protective role of vitamin E in biological systems, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, *53*, p. 1050S.
- [7] Bors W., Heller W., Michel C., Satan M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies, *Methods in Enzymology*, **1990**, *186*, p. 343.
- [8] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Rad. Biol. Med.*, **2002**, *33*(3), p. 337.
- [9] Ganther H.E., Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase, *Carcinogenesis*, **1999**, *20*(9), p. 1657.
- [10] Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Rad. Biol. Med.*, **1992**, *13*, p. 341.
- [11] Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, **2002**, *383*(6), p. 93.
- [12] Favier A., Cadet J., Kalaryanman R., Fontecave M., Pierre J.-L., *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhauser, New-York, **1995**.
- [13] Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C., Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.*, **2002**, *33*(5), p. 575.
- [14] Montagnier L., Olivier R., Pasquier C., *Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases*, Marcel Dekker, New York, **1998**.
- [15] Sies H., Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, **1997**, *38*.
- [16] The Alpha-tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancer in male smokers, *New. Engl. J. Med.*, **1994**, *330*, p. 1029.



Alain Favier

est professeur de biochimie, directeur du Laboratoire de recherche Lésions des acides nucléiques du CEA de Grenoble*, et directeur du Département de biologie intégrée au CHU de Grenoble.

* Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble, rue des Martyrs, 38054 Grenoble. Tél. : 04 76 76 54 84. Fax : 04 76 76 56 64. Courriel : favier@drfmc.ceng.cea.fr