

La vectorisation de pièges à radicaux libres

Nouvelle stratégie thérapeutique

Grégory Durand, Ange Polidori et Bernard Pucci

Abstract **Spin-traps vectorization: new therapeutic strategy**

Nowadays, it is well admitted that free radicals take place in a lot of natural cells process, but also in various diseases. This review set the record straight about the actual knowledge of free radical involvements in biological and therapeutic fields and the synthetic process able to inhibit their harmful effects in the organism. The synthetic antioxidants or spin-traps molecules currently proposed to reduce or to trap the free radicals are described. Among them, the efficiency of nitrones derived spin-traps and the potentialities of their vectorization to the cytoplasmic or the membrane areas by using amphiphilic carriers are underlined.

Mots-clés

Vectorisation, amphiphile, PBN, « spin-traps », antioxydants, radicaux libres.

Key-words

Vectorization, amphiphile, PBN, spin-traps, antioxidants, free radicals.

Du fait de leur haute réactivité, les espèces oxygénées réactives (EOR) sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires. Cette production d'espèces délétères est généralement équilibrée par leur consommation à vitesse égale par le système antioxydant endogène. La rupture de l'équilibre entre espèces pro- et anti-oxydantes est désignée par le terme de **stress oxydant**. Il est maintenant admis que le phénomène de stress oxydant est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington), de désordres pathologiques (syndrome d'ischémie-reperfusion), mais également dans les phénomènes de vieillissement.

En raison de l'implication des radicaux libres dans ces diverses pathologies, les recherches dans la conception de nouvelles molécules pouvant pallier un déficit du système de protection naturel antiradicalaire se sont largement intensifiées. Dans un premier temps, les chimistes ont développé des analogues des antioxydants naturels en les modifiant chimiquement afin d'augmenter leurs propriétés de piégeage des radicaux libres. Ils se sont ensuite intéressés à la mise au point de pièges plus spécifiques basés sur la réactivité particulière de certains groupements chimiques tels que les fonctions nitrones vis-à-vis des espèces radicalaires. Une des difficultés majeures d'une telle approche est de disposer de molécules biocompatibles aptes à franchir les membranes physiologiques et à atteindre leur site d'action. Dans cet article, nous aborderons les propriétés particulières des pièges à radicaux libres de type nitrone vis-à-vis d'un certain nombre de pathologies liées au stress oxydant et l'intérêt que peut représenter leur vectorisation à des fins thérapeutiques.

Les nitrones : des pièges à radicaux libres performants

Les **nitrones** sont des composés qui ont été initialement utilisés pour piéger des radicaux libres dont la durée de vie

était trop courte pour permettre leur observation directe en résonance paramagnétique électronique (RPE). La technique de piégeage de spin ou « spin-trapping » consiste à additionner au système étudié une molécule diamagnétique qui va servir de piège et qui va réagir de façon très rapide avec le radical pour donner un adduit de spin beaucoup plus stable et détectable en milieu physiologique. Les nitrones réagissent avec le radical libre par l'intermédiaire du carbone situé en position α de l'atome d'azote pour donner un adduit de spin particulièrement stable et persistant en raison de la présence d'une liaison π à 3 électrons entre l'atome d'azote et l'oxygène (schéma 1).

Glossaire

Capacité anti-apoptotique

Capacité à réduire ou supprimer le processus de mort cellulaire programmée appelé apoptose, processus qui permet de limiter la taille des populations cellulaires et d'éliminer certaines cellules indésirables. La surproduction de radicaux libres dans une cellule peut être un facteur déclenchant du phénomène d'apoptose.

Capacité antioxydante

Capacité d'une molécule à réduire ou supprimer l'oxydation des composés biologiques par les radicaux libres ou toutes molécules pro-oxydantes.

Étiologie

Recherche des causes d'une maladie.

Molécule diamagnétique

Molécule dont les orbitales ne possèdent pas d'électron non apparié.

Peroxydation lipidique

Processus d'oxydation des chaînes lipidiques insaturées conduisant à la formation d'un intermédiaire réactionnel peroxydique instable dont la décomposition entraîne la coupure de la molécule.

Radical libre

Atome ou molécule dont une orbitale au moins contient un électron non apparié. Un radical libre est une espèce douée de paramagnétisme lié au moment magnétique de spin de l'électron non apparié présentant une très grande réactivité.

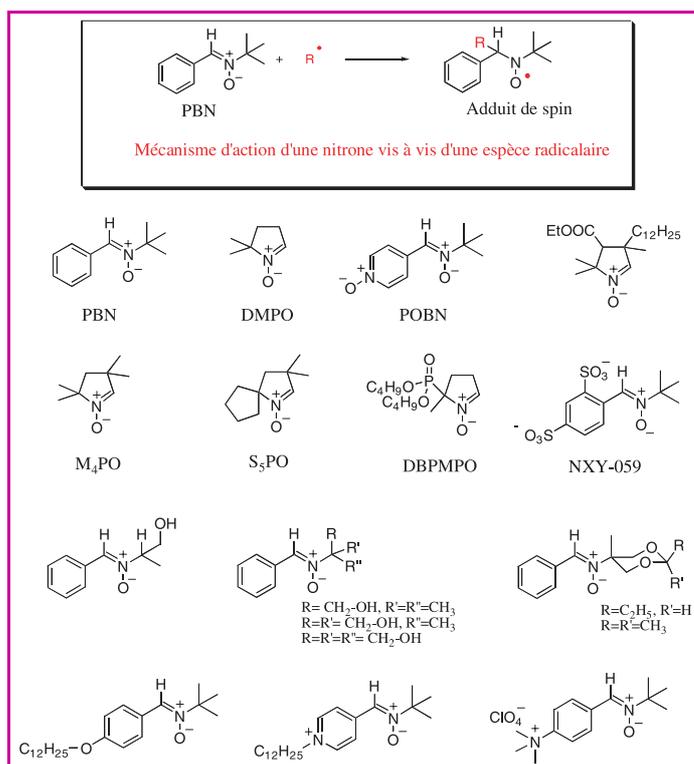


Schéma 1 - Technique de piégeage de spins et structures de quelques nitrones.

Les nitrones habituellement utilisées en spin-trapping sont l' α -phényl-*N-tert*-butylnitronne (PBN), la 5,5-diméthylpyrroline-*N*-oxyde (DMPO) et l' α -(pyridyl-1-oxyde)-*N-tert*-butylnitronne (POBN) (schéma 1).

Idéalement, en imagerie médicale, une molécule piège doit rester pharmacologiquement inerte. Or en 1986, Novelli et son équipe ont découvert que la PBN avait une influence considérable sur le métabolisme et la durée de vie de rats exposés à une endotoxine [1]. Ces résultats ont pu être confirmés par la suite et ont poussé la communauté scientifique à étudier le potentiel thérapeutique de la PBN dans diverses affections impliquant l'apparition de radicaux libres. A haute concentration, la PBN présente des effets protecteurs potentiels remarquables dans divers modèles expérimentaux. Les effets neuroprotecteurs sont actuellement les plus étudiés et font de la PBN un agent potentiellement utilisable dans de nombreuses pathologies associées à une mort neuronale par apoptose [2]. L'effet anti-apoptotique de la PBN est maintenant parfaitement admis [3]. Après injection intra-péritonéale chez le rat, elle est rapidement répartie dans tout l'organisme. En outre, son effet anti-inflammatoire renforce ses potentialités protectrices et neuroprotectrices [4]. Sa toxicité directe est très réduite, mais ses produits d'hydrolyse (benzaldéhyde et *tert*-butyl hydroxylamine) peuvent présenter une toxicité à plus long terme. Même si actuellement son mode d'action n'est pas encore parfaitement compris, de nombreux auteurs ont tenté d'améliorer les propriétés protectrices et la biodisponibilité de la PBN en réalisant des analogues de synthèse, potentiellement moins toxiques.

Les analogues de la PBN

De nombreux travaux ont été consacrés à la modification structurale de la PBN. Dans un premier temps, ceux-ci se

sont résumés à des modifications assez simples visant à moduler la biodistribution du piège par la variation de sa balance hydrophile-lipophile. Des modifications chimiques ont ainsi été réalisées sur les parties *N* terminales et aromatiques (schéma 1). Cependant, ces transformations se sont accompagnées généralement d'une diminution des capacités de piégeage de spin de ces molécules. De plus, peu de résultats biologiques probants ont été obtenus à partir de ces différents composés. Les recherches se sont donc orientées vers la synthèse de dérivés de la PBN présentant une meilleure aptitude à piéger les radicaux libres.

Les modifications chimiques ont essentiellement eu pour objectif d'améliorer les capacités de piégeage de la PBN, soit en augmentant la stabilité des adduits formés, soit en rigidifiant la fonction nitronne par cyclisation. C'est ainsi que la nitronne dérivée du guaiazulène (schéma 2) a la propriété de stabiliser plus efficacement l'adduit de spin formé et présente d'excellentes propriétés antioxydantes voisines de celle de la vitamine E, faisant de ce dérivé un puissant antioxydant de rupture de chaîne contrairement à la PBN [5]. Dhainault *et al* [6] ont mis au point la synthèse de dérivés comportant un motif imidazole dans le but de stabiliser les adduits de spin et de les rendre les moins réactifs possible vis-à-vis des constituants cellulaires les entourant. Les nitrones substituées par un groupement adamantane possèdent quant-à-elles une efficacité accrue de spin-trapping, mais présentent une très faible solubilité dans l'eau.

Constatant que lorsque la fonction nitronne présente une forte rigidité et une plus grande co-planéité, elle piège les radicaux libres de manière plus efficace, Thomas *et al* [7] ont préparé des PBN cycliques (schéma 2). Ces composés ont la faculté de piéger plus facilement les radicaux et diminuent le phénomène de peroxydation lipidique.

Notons enfin qu'actuellement, la société AstraZeneca teste en phase clinique 3, un dérivé disulfonate de la PBN, le NXY-059, pour le traitement des attaques cérébrales.

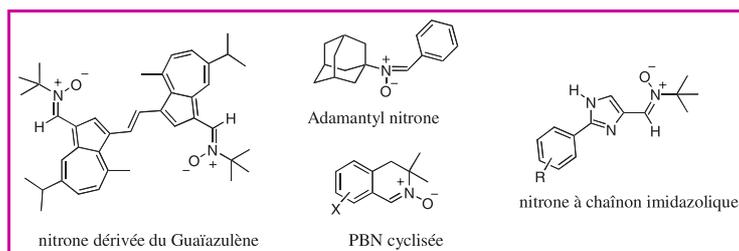


Schéma 2 - Nouvelle génération de nitrones permettant une stabilisation accrue des adduits de spin.

Vectorisation de la PBN : une nouvelle stratégie de lutte antioxydante

Les travaux concernant l'amélioration de l'activité thérapeutique de la PBN ont été en fait principalement axés sur l'augmentation de sa capacité de piégeage. Mais toutes les recherches actuelles démontrent que l'efficacité biologique d'un actif est fortement influencée par la modulation de sa balance hydrophile-lipophile et sa biodisponibilité. En effet, la PBN présente un potentiel thérapeutique indéniable, mais de fortes concentrations

doivent être utilisées en raison de sa faible aptitude à franchir les systèmes membranaires et à se répartir dans les compartiments cytosoliques. Par ailleurs, l'augmentation de la lipophilie de la molécule peut influencer considérablement sa capacité à traverser les membranes phospholipidiques, et donc à investir le compartiment cytoplasmique pour y jouer le rôle d'antioxydant. Tous les outils permettant une amélioration notable de la biodisponibilité tissulaire et cellulaire d'un actif comme la PBN peuvent être regroupés sous le terme de systèmes de vectorisation.

Deux objectifs thérapeutiques peuvent être poursuivis lors de l'élaboration d'un antioxydant : une protection physiologique vis-à-vis soit des radicaux produits à l'intérieur du compartiment cellulaire, soit des espèces radicalaires exogènes circulantes provenant d'une source externe à la cellule. Dans le premier cas, pour augmenter son efficacité, il apparaît nécessaire de favoriser la répartition intra-cytoplasmique du piège à radicaux ; dans l'autre, l'objectif essentiel sera sa localisation dans les membranes phospholipidiques.

Vectorisation par des transporteurs amphiphiles monocaténaire

Afin de favoriser le passage transmembranaire et donc la pénétration de la PBN dans la cellule, celle-ci doit être dotée d'un caractère amphiphile marqué, par le greffage d'une chaîne carbonée hydrophobe et d'une entité hydrophile. Une telle structure apporte à la molécule des propriétés tensioactives. En ce qui concerne la partie hydrophobe, la fixation d'une chaîne perfluorocarbonée est le choix le plus évident à faire car il permet d'éviter les problèmes de détergence membranaire et de cytotoxicité communément observés avec les tensioactifs hydrocarbonés. Pour la partie hydrophile, qui apporte l'hydrosolubilité nécessaire à la molécule, pour les mêmes raisons de biocompatibilité, l'utilisation de motifs glycosidiques non ioniques semble être le meilleur compromis. Dans cette optique, en collaboration avec l'UMR 6517 que dirige le professeur P. Tordo, nous avons mis au point un dérivé amphiphile de la PBN, la TA1PBN [8]. La partie aromatique de la PBN a été fonctionnalisée par un fragment amphiphile perfluorocarboné muni de deux motifs galactose (schéma 3). Une telle modification de la structure de la PBN permet de conserver ses capacités de piégeage de spin.

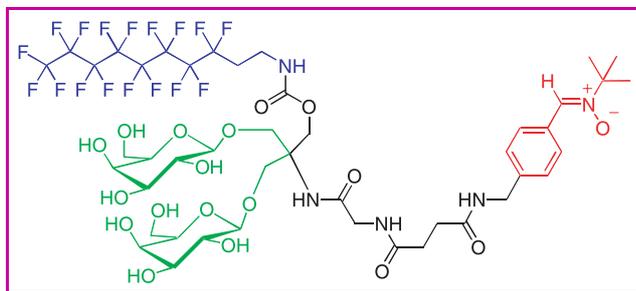


Schéma 3 - Structure de la TA1PBN.

La capacité antioxydante et anti-apoptotique de ce type de composés a été testée à l'hôpital Necker, dans le service du Dr P. Rustin, sur des fibroblastes provenant de patients atteints d'une maladie mitochondriale, « neurogenic ataxia pigmentosa » (NARP), initiée par une mutation du gène codant pour une protéine du complexe enzymatique V

de la chaîne mitochondriale. Ces fibroblastes présentent une importante surproduction d'enzymes superoxyde dismutase (SOD), et l'état de stress oxydant généré par cette mutation est accompagné d'une mort cellulaire par apoptose. Aucun antioxydant classique, y compris la PBN, ne présente d'activité de protection vis-à-vis de ces fibroblastes, alors que la TA1PBN provoque une baisse considérable de l'activité SOD et une forte diminution du pourcentage des cellules présentant une fragmentation de l'ADN (donc en état d'apoptose) [9]. Il apparaît dès lors évident que la structure amphiphile de la PBN est probablement un atout majeur pour sa pénétration intracellulaire et son approche du système membranaire mitochondrial.

Une nouvelle génération de PBN amphiphile dotée d'une structure plus simple, donc plus facile à synthétiser, a été ensuite développée [10]. Afin de pouvoir déterminer les éléments structurels influant sur la capacité antioxydante de ces composés, il était indispensable de pouvoir réaliser des modulations structurales de manière aisée grâce à l'utilisation d'un schéma de synthèse facile à mettre en œuvre.

Dans ce but, le motif PBN a été introduit au cœur même de la structure de transport amphiphile. Le motif nitronne apparaît alors non seulement comme la fonction active, mais également comme un bras de liaison entre parties polaire et apolaire de la molécule amphiphile (schéma 4).

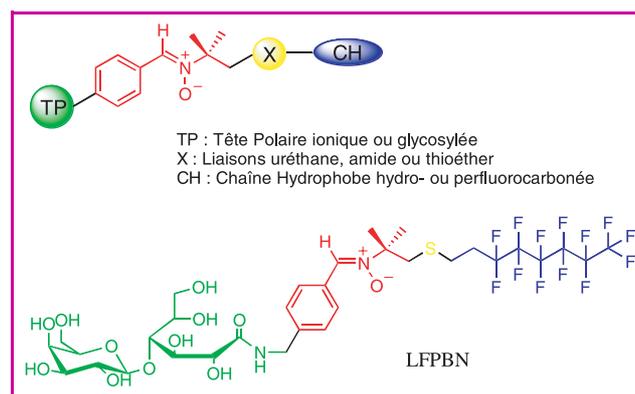


Schéma 4 - Structure générale des nitrones amphiphiles monocaténaire.

Les mesures RPE ont clairement montré que l'introduction de la partie nitronne au cœur de la molécule n'inhibe en rien sa capacité à piéger les radicaux libres [11]. Par ailleurs, la chaîne hydrophobe fluorocarbonée ne confère aucun pouvoir détergent à ces molécules et de ce fait n'introduit aucune cytotoxicité limitant leur utilisation thérapeutique. Leur capacité à limiter ou à bloquer le phénomène d'apoptose et la dégradation des constituants cellulaires par des espèces radicalaires oxygénées a été évaluée sur différents systèmes cellulaires. Les tests réalisés sur des fibroblastes atteints du syndrome NARP se sont révélés tout aussi positifs qu'avec le composé TA1PBN. De plus, alors que la PBN est inactive, les dérivés de type LFPBN (schéma 4) réduisent très fortement, à une concentration de 100 μM , le phénomène d'apoptose provoqué par l'exposition de neurones corticaux de rat à une solution d'eau oxygénée. Enfin, lorsque des globules rouges sont mis au contact des composés de type LFPBN (à des concentrations inférieures à 100 μM), le processus hémolytique généralement observé lors d'un stress oxydant

induit par initiation radicalaire est inhibé [12]. Ces résultats démontrent d'une part l'importance du facteur amphiphile sur l'efficacité biologique de ces composés, mais également le potentiel thérapeutique très important des dérivés amphiphiles de la PBN.

Vectorisation par des transporteurs amphiphiles bicaténaires

Afin de favoriser une insertion du piège à radicaux libres dans la membrane cellulaire lipidique et la protéger des agressions radicalaires externes, des **analogues bicaténaires** de ces composés ont été préparés (schéma 5) [13].

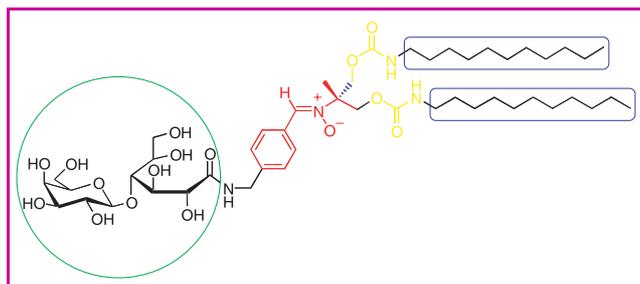


Schéma 5 - Structure d'une nitronne bicaténaire.

De tels composés sont miscibles avec des films phospholipidiques et limitent très fortement l'oxydation des phospholipides naturels insaturés lorsque ces derniers sont soumis aux effets d'une source oxydante radiative. Ils révèlent en effet une efficacité largement supérieure aux plasmalogènes qui sont des structures lipidiques naturelles spécialisées dans la protection des membranes vis-à-vis des agressions radicalaires. De ce fait, de telles structures sont susceptibles d'induire une protection cellulaire vis-à-vis d'une source oxydante exogène et de trouver, dès lors, des applications intéressantes aussi bien dans le domaine thérapeutique que cosmétologique.

Conclusion

L'intervention des radicaux libres oxygénés dans les phénomènes d'apoptose et d'oxydation cellulaire est maintenant démontrée. Leur implication dans des maladies aussi graves que l'athérosclérose, la nécrose cellulaire lors des brûlures graves ou les maladies neurodégénératives, est plus que soupçonnée. De ce fait, la mise au point de systèmes capables d'inhiber leurs effets délétères ou de les piéger est devenue un sujet de recherche majeur. De nombreuses molécules dites antioxydantes ou antiradicalaires ont été proposées et ont montré une

excellente activité *in vitro*. Par contre, leur activité *in vivo* est dans bien des cas sérieusement limitée par leur toxicité, leur biodistribution inadéquate ou leur accumulation dans certains tissus. De ce fait, la modulation des propriétés physico-chimiques, ou mieux, le transport de ces structures antioxydantes ou antiradicalaires par des systèmes vectoriels adaptés et choisis en fonction du site d'action ciblé, apparaît comme un sujet de recherche majeur dans les années à venir.

Références

- [1] Angiolini P., Consales G., Lippi R., Tani R., Novelli G.P., *Oxygen Free Radicals in Shock*, G.P. Novelli, F. Ursini (eds), Krager Basel, **1986**.
- [2] Nakao N., Brundin P., *Neuroscience*, **1997**, *76*, p. 749.
- [3] Li P.A., He Q.P., Nakamura L., Csiszar K., *Free Rad. Biol. Med.*, **2001**, *37*, p. 1191.
- [4] Kotake Y., Sang H., Miyajima T., Wallis G.L., *Biochem. Biophys. Acta*, **1998**, *1448*, p. 77.
- [5] Becker D.A., Ley J.J., Etchegoyen L., Alvarado R., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, p. 4678.
- [6] Dhainaut A., Tizot A., Raimbaud E., Lockhart B., Lestage P., Goldstein S., *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, p. 2165.
- [7] Thomas C.E., Ohlweiler D.F., Carr A.A., Nieduzak T.R., Hay D.A., Adams G., Vaz R., Bernotas R.C., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, p. 3097.
- [8] Ouari O., Polidori A., Pucci B., Tordo P., Chalier F., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, p. 3554.
- [9] Geromel V., Kadhom N., Cebalos-Picot I., Ouari O., Polidori A., Munnich A., Rotig A., Rustin P., *Hum. Mol. Genet.*, **2001**, *10*, p. 1221.
- [10] Durand G., Polidori A., Salles J.-P., Pucci B., *Bio. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *13*, p. 859.
- [11] Durand G., Polidori A., Ouari O., Tordo P., Geromel V., Rustin P., Pucci B., *J. Med. Chem.*, sous presse.
- [12] Durand G., Polidori A., Salles J.-P., Prost M., Durand P., Pucci B., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2003**, *13*, p. 2673.
- [13] Morandat S., Durand G., Polidori A., Desigaux L., Bortolato M., Roux B., Pucci B., *Langmuir*, sous presse.



G. Durand

Grégory Durand¹ et **Ange Polidori**² sont maîtres de conférences et **Bernard Pucci**³ est professeur au Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels d'Avignon*.



A. Polidori



B. Pucci

* Laboratoire de chimie bioorganique et des systèmes moléculaires vectoriels, Faculté des Sciences, Université d'Avignon, 33 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon.
Fax : 04 90 14 44 49.

¹ Tél. : 04 90 14 44 45.

Courriel : gregory.durand@univ-avignon.fr

² Tél. : 04 90 14 44 45.

Courriel : ange.polidori@univ-avignon.fr

³ Tél. : 04 90 14 44 42.

Courriel : bernard.pucci@univ-avignon.fr

Chères lectrices, Chers lecteurs,

L'enquête à laquelle vous avez été nombreux à répondre nous a montré, entre autres, que vous teniez à ce que *L'Actualité Chimique* continue à publier les rubriques *Brèves scientifiques*, *Informations générales*, *Manifestations*, *Livres et médias* et *Activités de la SFC*. Nous nous excusons auprès de vous de ne pas avoir été en mesure de publier régulièrement ces rubriques dans nos derniers numéros, du fait d'un impératif du nombre de pages.

En 2004, la rédaction fera tout son possible pour que ces rubriques continuent à vivre dans nos colonnes. D'autre part, les résultats de l'enquête seront publiés prochainement.

La rédaction