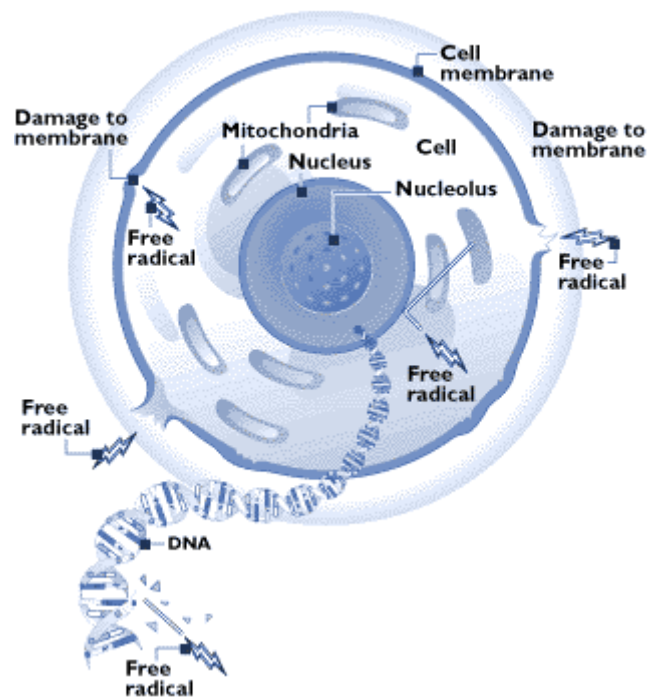


Adjélé Wilson

Leyli Salamatian

## Les Radicaux Libres : Une question d'équilibre



Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines  
DESS IST  
2002-2003



Notre Santé dépend en grande partie de notre façon de vivre et de nous alimenter.

## SOMMAIRE

Introduction.....	p.6
<u>1. L'oxygène et ses dérivés.....</u>	<u>p.7</u>
1.1.L'oxygène moléculaire.....	p.7
1.2.Les formes dérivées de l'oxygène.....	p.7
1.2.1. Oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ).....	p.7
1.2.2. L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ).....	p.8
1.2.3. Peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	p.8
1.2.4. Radical hydroxyle( $\text{OH}^\cdot$ ).....	p.8
1.3.Production des radicaux libres dans l'organisme.....	p.9
1.4.Propagation et toxicité radicalaire.....	p.10
<u>2. Systèmes antioxydants de l'organisme.....</u>	<u>p.11</u>
2.1. Systèmes enzymatiques antioxydants.....	p.12
2.1.1. Superoxyde dismutase.....	p.12
2.1.2. Catalase.....	p.13
2.1.3. Glutathione peroxydase et glutathione réductase .....	p.13
2.2. Molécules piègeuses de métaux.....	p.14
2.3. Antioxydants d'origine alimentaire.....	p.15
2.3.1. La vitamine E (tocophérol).....	p.15
2.3.2. La vitamine C (ascorbate).....	p.16
2.3.3. Le bêta-carotène.....	p.17
2.3.4. Les flavonoïdes.....	p.17
<u>3.Pathologies.....</u>	<u>p.18</u>
3.1 Le stress oxydant.....	p.18
3.2. Rôle des radicaux libres dans les maladies neurodégénératives.....	p.20

3.2.1 La sclérose latérale amyotrophique.....	p.20
3.2.2 La maladie de Parkinson.....	p.21
3.3. Rôle des radicaux libres dans le cancer.....	p.22
3.3.1. Les différentes étapes de développement d'un cancer.....	p.22
3.3.2 Les radicaux libres et l'initiation.....	p.24
3.3.3. Les radicaux libres et la promotion.....	p.24
3.3.4 Le rôle des antioxydants dans le cancer .....	p.25
<u>4. Actualités.....</u>	p.26
4.1 Brevets.....	p.26
4.2 Thèses, centres de recherche et firmes pharmaceutiques.....	p.29
4.2.1 les thèses.....	p.29
4.2.2 Les centres de recherche hors France.....	p.31
4.2.3 Les firmes pharmaceutique.....	p.31
4.3 Salons et conférences.....	p.32
Conclusion.....	p.33
Bibliographie.....	p.35

## Introduction

Dans la plupart des molécules organiques, les atomes voisins sont liés les uns aux autres par des liaisons covalentes, c'est-à-dire fondées sur l'appariement naturel des électrons de vecteur magnétique ou <<spin>> opposé. Lors d'une irradiation, de l'exposition à une source d'énergie lumineuse ou thermique d'intensité suffisante, ou de réactions chimiques d'oxydoréduction, le couple électronique peut être rompu par rupture homolytique d'une liaison covalente ( $R-R' \rightarrow R^{\bullet} + R'^{\bullet}$ ). La molécule, l'atome neutre ou ionisé se trouve de ce fait porter un ou plusieurs électrons <<célibataires>> sur son orbitale externe et est désigné sous le terme de <<radical libre>>. La tendance naturelle des électrons non appariés à interagir avec les électrons de molécules ou d'atomes voisins, pour reformer des liaisons chimiques covalentes, confère aux radicaux libres une très grande instabilité et une extrême réactivité chimique. L'appariement de deux radicaux libres permet la mise en commun de leur électron célibataire pour former un doublet donnant une molécule stable ( $R^{\bullet} + R'^{\bullet} \rightarrow R-R'$ ). Mais le plus souvent, le radical libre va oxyder de nombreuses molécules biologiques (lipides, glucides, protéines et acides nucléiques) ne comportant pas d'électron célibataire provoquant ainsi une réaction en chaîne au cours de laquelle apparaissent de nouveaux radicaux, dits secondaires ( $R^{\bullet} + R' \rightarrow R + R'^{\bullet}$ ).

Bien que les sources suivantes :

- Rayonnement électromagnétique (radiations ionisantes, lumière ultraviolette)
- Métaux de transition
- Fumées de combustion (de cigarette, de bois, de matériaux de construction)
- Produits chimiques :
  - Antiseptiques (métronidazole),
  - Médicaments (acétaminophène [tylénol], adriamycine [médicament anti-cancer], phénacétine [anti-inflammatoire non stéroïdien]),
  - Pesticides (DDT [dichloro-diphényl-trichloro-éthane, insecticide], paraquat, [herbicide]),
  - Solvants (benzène)
- Poussières (d'amiante, de silice),

puissent causer la formation de radicaux libres, ces derniers peuvent se former dans l'organisme dans le cadre de certains phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, dans les mitochondries, l'oxygène moléculaire est réduit de façon progressive et contrôlée en eau par apport de 4 électrons. En revanche, sa réduction incomplète conduit à des espèces extrêmement

réactives communément appelées radicaux libres de l'oxygène, RLO (ou encore, ROI, reactive oxygen intermediates ou ROM, reactive oxygen metabolites).

Les radicaux libres de l'oxygène sont des armes à double tranchant : ils protègent l'organisme contre les microorganismes et les cellules tumorales mais ils sont aussi à l'origine de l'altération et de l'usure des tissus donc responsables de la toxicité de l'oxygène et de ses effets mutagènes. L'ensemble de ces effets négatifs de l'oxygène est appelé le stress oxydant, qui peut être considérablement majoré dans certaines circonstances pathologiques.

Le but de ce projet est d'illustrer le fait que la production de radicaux libres de l'oxygène est finement régulée et remplit une fonction physiologique, d'étudier les systèmes de défense de notre organisme contre les radicaux libres : les antioxydants, décrire les mécanismes qui entrent en jeu lors de certaines maladies à savoir le cancer et les maladies neurodégénératives (Maladie de Parkinson, Sclérose latérale amyotrophique) et enfin de traiter l'actualité des radicaux libres.

## **1. L'oxygène et ses dérivés**

### **1.1. L'oxygène moléculaire**

L'oxygène moléculaire  $O_2$  que nous respirons est une molécule constituée de deux atomes d'oxygène. A l'état fondamental, l'oxygène est un biradical puisqu'elle comporte deux électrons célibataires à spins parallèles placés dans des orbitales externes distinctes,  $^*O\equiv O^*$ . Une telle configuration lui confère une très grande stabilité et une faible réactivité lui permettant d'interagir seulement avec les molécules ayant comme lui deux électrons célibataires à spins parallèles. En revanche, et sous réserve d'un apport d'énergie suffisant, la molécule d'oxygène peut aisément acquérir un électron supplémentaire par appariement avec l'un de ses électrons célibataires. Il acquiert alors un électron ( $O_2^-$  ou l'anion superoxyde) et de ce fait, génère des espèces radicalaires :  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène ou <<eau oxygénée>>),  $OH^\cdot$  (radical hydroxyle) etc... Par ailleurs, certaines réactions chimiques ou photochimiques (en particulier avec les UVA) conduisent à l'excitation de la molécule de dioxygène. Cet état noté,  $^1O_2$ , est appelé oxygène singulet.

### **1.2. Les formes dérivées de l'oxygène**

#### 1.2.1. Oxygène singulet ( $^1O_2$ )

L'oxygène singulet est constitué d'un seul atome d'oxygène. Cette forme de l'oxygène se caractérise par la présence d'électrons périphériques à spin antiparallèle. Il est très instable et

extrêmement réactif. Elle se désactive au contact des molécules de son environnement, notamment l'eau en libérant de l'énergie. Sa durée de vie est très limitée.

### 1.2.2. L'anion superoxyde ( $O_2^-$ )

L'anion superoxyde est le résultat de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire c'est-à-dire l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire :  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ .

En milieu aqueux, l'anion superoxyde est peu réactif, ce qui lui permet de se déplacer assez loin de son lieu de production et se dismute spontanément pour donner du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxygène. Sa charge électrique le rend incapable de diffuser à travers les membranes biologiques. En dépit d'une réactivité assez faible, l'anion superoxyde présente des dangers pour les structures biologiques dans la mesure où il peut réduire des métaux comme le fer ou le cuivre qui deviennent réactifs.

### 1.2.3. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Il est aussi appelé dioxyde de dihydrogène ou <<eau oxygénée>>. Le peroxyde d'hydrogène résulte de la réduction à deux électrons de l'oxygène. Il peut être généré soit par :

- dismutation de l'anion superoxyde :  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ,
- réduction univalente de l'anion superoxyde :  $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$  ou
- réduction bi-électronique de l'oxygène :  $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ , réaction catalysée par des enzymes comme la glucose oxydase.

L'absence de charges électriques à sa surface le rend très lipophile et peu réactif en milieux aqueux. En présence d'ions métalliques, tels que les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) et cuivre ( $Cu^+$ ), le peroxyde d'hydrogène peut aussi se décomposer en radicaux hydroxyl ( $OH^\cdot$ ), l'oxydant le plus puissant produit par les organismes vivants. Le peroxyde d'hydrogène est un radical libre potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques, font qu'il puissent se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse.

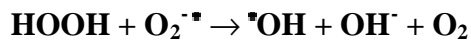
### 1.2.4. Radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ )

Il est généré dans les cellules soit par :

- clivage réducteur du peroxyde d'hydrogène :  $H_2O_2 + H^+ + e^- \rightarrow H_2O + OH^\cdot$
- coupure homolytique du peroxyde d'hydrogène, sous l'influence de rayons ionisants par exemple :  $H_2O_2 \rightarrow OH^\cdot + OH^\cdot$
- décomposition du peroxyde d'hydrogène, catalysée par des métaux, en particulier le fer ou le cuivre (réaction de Fenton) :  $H_2O_2 + Fe^{2+} (Cu^+) \rightarrow ^*OH + OH^- + Fe^{3+} (Cu^{2+})$



- interaction de l'eau oxygénée avec l'ion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss):

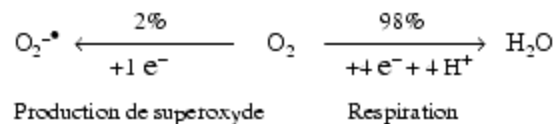


Il est extrêmement réactif avec tous les substrats de son entourage et représente donc une source potentielle de lésions moléculaires, cellulaires et tissulaires importantes. Il intervient directement dans la dégradation des acides nucléiques (ADN), la peroxydation des lipides détériorant les membranes lipidiques des cellules et l'oxydation des protéines.

### 1.3. Production des radicaux libres dans l'organisme

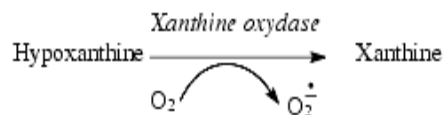
Les radicaux étant très réactifs ont une durée de vie extrêmement courte. Il est donc difficile d'étudier leur métabolisme, si bien que les connaissances concernant leur production dans des conditions physiologiques et pathologiques sont encore limitées. La formation de radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires :

- les mitochondries : la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2% d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux OH<sup>·</sup>



- le cytosol où diverses réactions enzymatiques peuvent produire des radicaux superoxyde et de l'eau oxygénée.

a. La xanthine oxydase (responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine), l'aldéhyde oxydase, la galactose oxydase sont à l'origine de la formation de radicaux superoxyde O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.



b. D'autres enzymes interviennent dans la production de radicaux libres via les cellules immunitaires comme les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles pour détruire les microorganismes, des macromolécules étrangères ou des cellules en décomposition des tissus nécrotiques qu'ils ont captés par endocytose. En plus de ces enzymes, ces cellules présentent un système oxydasique membranaire, appelé NADPH oxydase, producteur d'anion superoxyde, qui peut être activée lorsque ces cellules sont sollicitées via leurs récepteurs de surface pour migrer vers des microorganismes et phagocyter ceux-ci.

Un certain nombre de médicaments, notamment l'adriamycine, la bléomycine et des toxiques comme le paraquat, constituent une source renouvelable de radicaux libres, grâce à des phénomènes de recyclage, c'est-à-dire de régénération des formes oxydées/réduites, appelés cycles futiles. Les deux exemples ci-dessous (fig.1,2) montrent la formation de radicaux superoxydes à partir de l'adriamycine et du paraquat, changeant d'état d'oxydoréduction par acceptation d'un électron qui est ensuite cédé à l'oxygène, ainsi transformé en ion superoxyde.

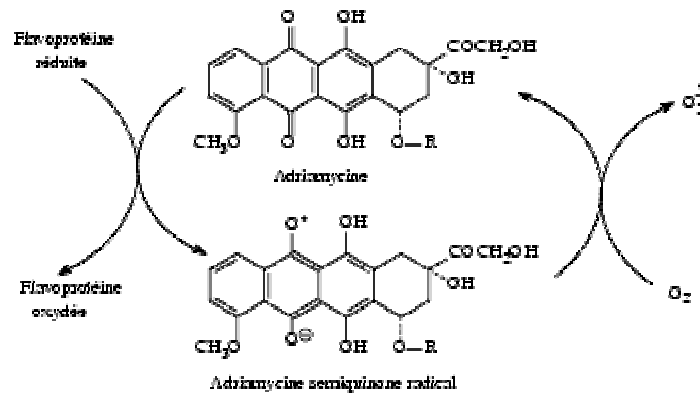


Figure 1 : Exemple de l'adriamycine

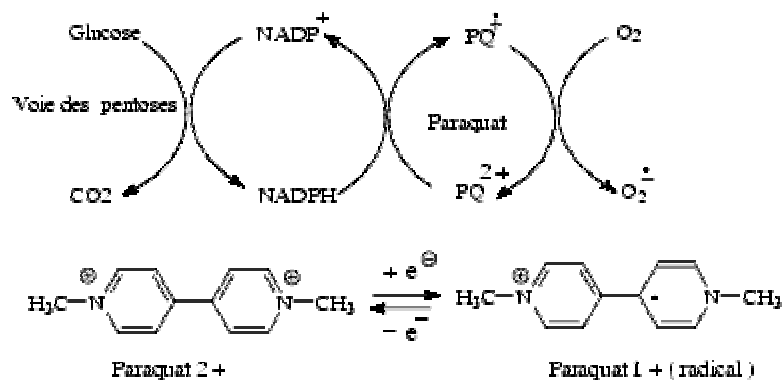


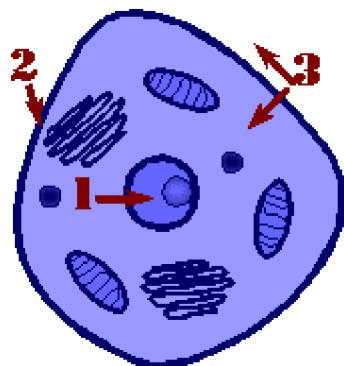
Figure 2 : Exemple du paraquat

La génération de radicaux libres apparaît donc essentiellement intracellulaire, mais elle peut s'effectuer dans le milieu extracellulaire par des phénomènes d'auto oxydation de l'hémoglobine, des flavines réduites, des quinones réduites et des catécholamines.

#### 1.4. Propagation et toxicité radicalaire

Les radicaux libres étant très réactifs, ils réagissent avec les premières molécules qu'ils rencontrent et particulièrement les lipides, les acides nucléiques et les acides aminés. Sans entrer dans les détails, HO<sup>•</sup> initie une cascade de réactions en extrayant un atome H, par exemple à un

groupement méthylène d'un acide gras insaturé ( $RH + HO\cdot \rightarrow R\cdot + H_2O$ ). L'atome de carbone muni d'un électron célibataire, va capturer une molécule d' $O_2$  donnant naissance à un radical peroxy  $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ . Cette réaction de peroxydation va pouvoir se propager de proche en proche par création d'un nouveau radical carboné, selon la réaction  $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$ . Les acides gras ainsi modifiés, altèrent la perméabilité membranaire (fig.3 (2)), pouvant aller jusqu'à sa désintégration. De la même façon, les aminoacides d'une protéine (fig.3 (3)), peuvent subir des phénomènes de carbonylation ( $=C=O$ ), rendant les protéines ainsi modifiées, sensibles aux protéases. Enfin les bases de l'ADN peuvent également être oxydées, source de mutations ou d'arrêt de réplication de l'ADN (fig.3 (1)). A ces effets directs des RLO, s'ajoutent divers effets indirects participant à l'inflammation et aux lésions cellulaires comme l'activation de phospholipases génératrices de prostaglandines et de leucotriènes, la synthèse de cytokines inflammatoires (IL1, TNF) et la mise en route de la machinerie apoptotique provoquant la mort cellulaire. Heureusement, ces effets délétères des radicaux libres sont fortement atténués grâce aux nombreux systèmes de défense de l'organisme.



- 1 : Noyau (ADN)
- 2 : Membrane plasmique (lipides)
- 3 : Cytosol et milieu extracellulaire (Protéines)

*Figure 3. Les sites d'action des radicaux libres dans la cellule*

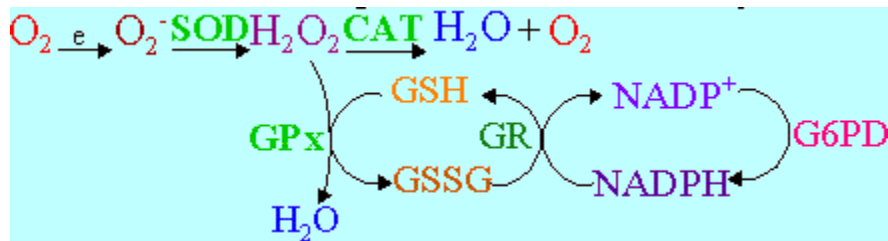
## 2. Systèmes antioxydants de l'organisme

Afin de contrer l'action oxydante des radicaux libres, l'organisme dispose de mécanismes protecteurs :

- des systèmes enzymatiques antioxydants spécifiques présents dans la plupart des cellules.
- des enzymes de séquestration des métaux libres de transition.
- des antioxydants d'origine alimentaire susceptible de piéger les radicaux libres sous une forme peu réactive.

## 2.1. Systèmes enzymatiques antioxydants

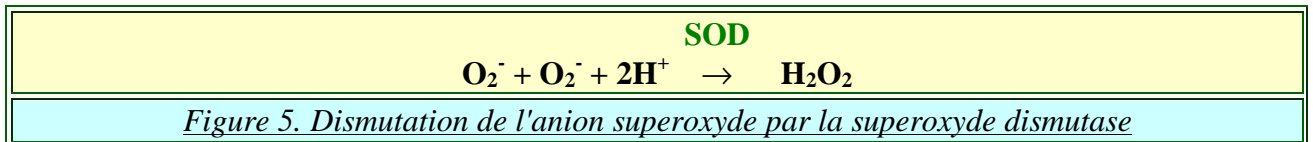
Trois enzymes forment la clé de voûte de ce système antioxydant (fig.4). Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT), et de la glutathione peroxydase (GPx) et des autres enzymes qui lui sont associées.



*Figure 4 : Réactions chimiques liées aux systèmes enzymatiques antioxydants*

### 2.1.1. Superoxyde dismutase

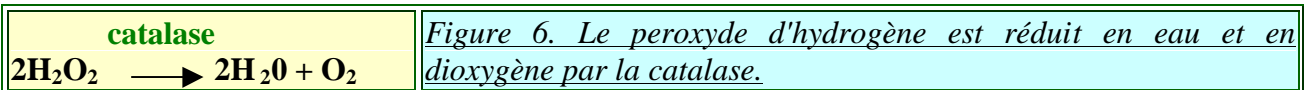
La superoxyde dismutase, ou SOD, catalyse la dismutation de deux ions  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène à pH neutre (fig.5) :



La transformation du radical superoxyde en  $H_2O_2$  peut s'effectuer spontanément mais la SOD l'accélère environ 10 000 fois. L'enzyme SOD est inductible, sa biosynthèse est augmentée par l'hyperoxygénation et par certains toxiques comme le paraquat. La SOD s'attaque donc à l'anion superoxyde pour arrêter à la base les réactions en chaîne. Trois sortes de SOD ont été identifiées dans la cellule : la SOD à cuivre et à zinc (Cu,ZnSOD) que l'on retrouve dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires (appelée EC-SOD) et la SOD à fer et à manganèse (Fe,MnSOD) qui se trouve dans les mitochondries. Cette dernière n'est pas produite en permanence, mais sa concentration augmente en réponse à une "attaque" oxydative. Par contre, les deux formes de SOD à cuivre et zinc sont produites continuellement, même en anaérobie (absence de dioxygène) et c'est le cuivre et le manganèse qui sont impliqués dans la catalyse.

### 2.1.2. Catalase

Le rôle de la catalase, enzyme confiné dans le cytosol et dans les peroxysomes, est d'accélérer la réaction spontanée qui transforme l'eau oxygénée en eau et en dioxygène(fig.6) et d'éviter ainsi la formation de radicaux \*OH.



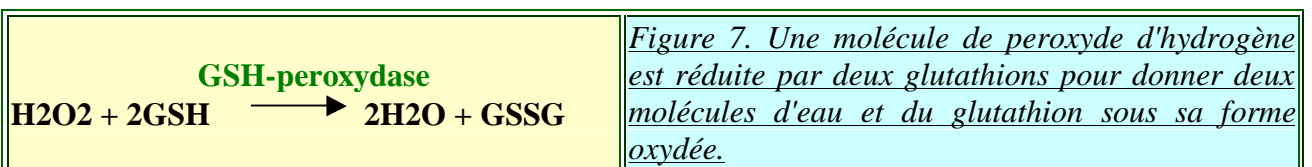
La plupart des cellules aérobiques (présence de dioxygène) contiennent cette enzyme. Elle a une forte concentration dans le foie et dans les globules rouges.

### 2.1.3. Glutathion peroxydase et glutathion réductase

La glutathion peroxydase (GSH-peroxydase) et la glutathion réductase (GSH-reductase) constituent le second grand système enzymatique antioxydant des cellules.

#### **Glutathion peroxydase (GSH-peroxydase)**

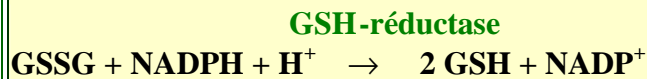
La GSH-peroxydase, enzyme à sélénium présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, transforme le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes lipidiques. Le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes sont réduites en présence de glutathion. Deux molécules de glutathion cèdent deux H au peroxyde d'hydrogène. Les deux glutathions forment une liaison dissulfure alors que le peroxyde d'hydrogène donne deux molécules d'eau H<sub>2</sub>O (fig.7).



Cette enzyme, par sa dépendance ou non au sélénium, se distingue en deux types. Le type qui est dépendant au sélénium réagit fortement au peroxyde d'hydrogène et aux peroxydes organiques. Le type indépendant au sélénium, par contre, ne réagit que faiblement par rapport aux peroxydes organiques. Il a également d'autres fonctions, dont la principale est la détoxification d'agents cancérigènes.

#### **Glutathion réductase (GSH-réductase)**

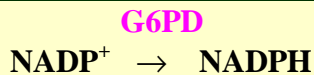
Le maintien de l'activité de la GSH-peroxydase nécessite la régénération du glutathion réduit GSH qui est assuré par la GSH-réductase. Dans le cadre de cette réaction, la GSH-réductase utilise un cofacteur le NADPH (fig.8).



*Figure 8. La glutathion sous sa forme oxydée est régénéré en glutathion par la GSH-réductase qui utilise du NADPH.*

La GSH-réductase se retrouve dans le cytosol et dans les mitochondries, c'est au dire au même niveau que le GSH-péroxydase.

Cette réaction produit du  $\text{NADP}^+$  qui sera régénéré en NADPH par le G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase), enzyme appartenant à la voie des pentoses (fig.9).



*Figure 9. Le  $\text{NADP}^+$  est régénéré en NADPH par le G6PD.*

La consommation de glutathion réduit provoqué par le fonctionnement de la GSH-péroxydase lorsqu'il n'est pas compensé par la GSH-réductase nécessitant un apport NADPH, crée un déficit cellulaire en glutathion et en groupe R-SH.

Les enzymes ne constituent pas la seule protection de l'organisme contre les radicaux libres. L'organisme limite l'extension des réactions radicalaires par piégeage des métaux.

## 2.2 Molécules piègeuses de métaux

Les métaux sont rarement à l'état libre dans l'organisme. Liés à différentes molécules organiques, transferrine, ferritine, céruloplasmine, etc..., ils perdent partiellement ou totalement leur activité de stimulation des réactions radicalaires. Pour favoriser la formation du radical  $\cdot\text{OH}$ , le cuivre et le fer doivent être à l'état cuivreux  $\text{Cu}^+$  et ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ , c'est-à-dire à l'état réduit, donc leur oxydation diminue leur toxicité. Ainsi la céruloplasmine en catalysant l'oxydation du fer, réduit sa toxicité :  $4 \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{Fe}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O}$ .

C'est également la protéine de stockage du cuivre la plus abondante dans le plasma. Elle est capable de lier efficacement six atomes d'ion cuivreux par molécule et ne les libère que lorsqu'elle est dégradée. La transferrine, glycoprotéine plasmatique peut lier très efficacement deux atomes de fer ferrique par molécule à pH physiologique. Associé à cette protéine, ce dernier est alors incapable d'être impliqué dans des mécanismes d'oxydoréductions générateurs de radicaux libres. Dans les conditions normales, seulement 30% de ces protéines sont associées à du fer, ce qui laisse assez de molécules libres pour lier ce métal s'il devient excédentaire. Une augmentation de la synthèse de métallothionéines, protéines qui fixent les métaux, joue aussi un rôle protecteur contre la toxicité des radicaux libres.

L'organisme dispose d'une troisième ligne de défense qui permet de réduire les radicaux libres qui ont pu survivre aux deux autres systèmes de défense : les antioxydants d'origine alimentaire.

### 2.3. Antioxydants d'origine alimentaire

Un certain nombre de substances d'origine alimentaire (vitamine E et C, carotènes et flavonoïdes) s'opposent à la propagation des radicaux libres, très souvent en formant à partir d'un radical très réactif un autre radical beaucoup moins réactif. Elles sont capables de neutraliser un seul radical libre par molécule : on les appelle pour cela des piègeurs stœchiométriques. Ils n'agissent qu'à des concentrations élevées et ne jouent qu'un rôle négligeable par rapport aux enzymes précédentes. Par exemple, l'acide urique a été présenté comme un véritable élixir de jeunesse... Certains protecteurs stœchiométriques sont régénérables et se comportent comme des agents presque catalytiques, capables d'éliminer de nombreux radicaux nocifs.

#### 2.3.1. La vitamine E (tocophérol)

Terme générique désignant une famille de substances (tocophérols  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et tocotriénols  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), la vitamine E est le plus puissant des antioxydants de l'organisme. Seule la forme alpha de la vitamine E est retenue par l'organisme car elle est plus active biologiquement. Elle est liposoluble et s'incorpore facilement dans les membranes cellulaires qui, étant riches en acides gras polyinsaturés facilement oxydables, sont très exposées aux dommages induits par les radicaux libres (fig.10). Elle réagit avec les radicaux peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) qui, sont fabriqués dans les membranes pour former un radical tocophéryl plus stable protégeant ainsi les membranes cellulaires et les lipoprotéines :  $\text{a-tocophérol-OH} + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \text{a-tocophérol-O}^\bullet + \text{LOOH}$

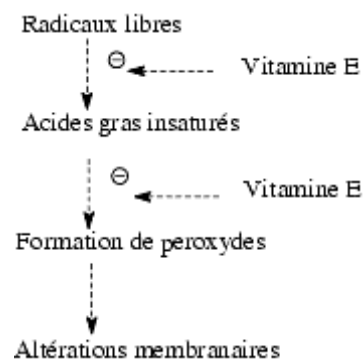


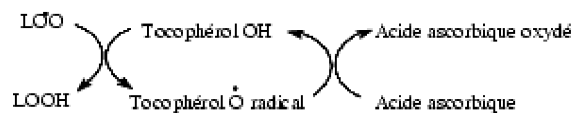
Figure 10. Action anti-radicalaire de la vitamine E

Les apports nutritionnels conseillés s'élèvent à 12 mg/j, les principales sources étant les noix, les huiles végétales (soja, maïs, coton), les margarines, les salades, les bananes et les céréales.

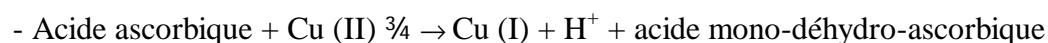
L'effet antioxydant de la vitamine E sur les lipoprotéines aurait lieu pour des doses de 150 à 300 mg/j. Mais ces résultats appellent à la prudence : une telle supplémentation à doses non nutritionnelles ne serait pas sans risque d'accident, en particulier vasculaire, comme l'ont montré plusieurs études. De plus, l'effet bénéfique de la vitamine E se trouve renforcée par une consommation optimale de vitamine C. Car la vitamine E oxydée est régénérée, c'est-à-dire réduite in situ, sous sa forme antioxydante active, par la vitamine C de telle manière que la surveillance de la menace oxydante est maintenue.

### 2.3.2. La vitamine C (ascorbate)

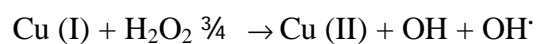
Autre grande vitamine antioxydante, la vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrosoluble ayant à la fois un rôle pro-oxydant et antioxydant. Il se trouve dans le jus de citron. Son activité antioxydante est comparable à celui de l'*alpha*-tocophérol au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule. Il est capable de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxyles et peroxydes. Elle réagit également avec le radical tocophéryl, en régénérant la vitamine E, en devenant le radical ascorbyle A<sup>-</sup>, également très stable :



L'acide ascorbique a une activité pro-oxydante en favorisant la formation de radicaux hydroxyles en présence de fer et de cuivre :



- Le cuivre I réagit ensuite avec l'eau l'oxygénée avec production d'un radical OH<sup>•</sup>



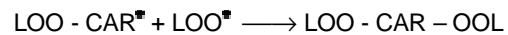
En France, les apports nutritionnels conseillés sont de 100 mg/j, avec des besoins supplémentaires de 20 à 40 mg/j chez les fumeurs, soumis au stress oxydant. Or, près de 20 % des adultes consomment moins de 2/3 des apports conseillés, plus particulièrement dans la tranche des 60 ans et plus. La vitamine C est régénérée par d'autres molécules comme le glutathion, et des enzymes, la glutathion peroxydase ou les superoxydes dismutases.

Mais beaucoup d'autres substances, dont les nombreux pigments caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) possèdent aussi une activité antioxydante importante.



### 2.3.3. Le bêta-carotène

Encore appelés provitamines A (certains sont des précurseurs de la vitamine A), les caroténoïdes constituent un groupe de composés important (plus de 600 molécules). On les trouve dans les fruits, les carottes, les légumes rouges et verts. Tous possèdent une forte activité antioxydante, notamment le  $\beta$ -carotène :  $CAR + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOO - CAR^{\bullet}$



Le bêta-carotène est un piègeur non stœchiométrique d'oxygène singulet,  $^1O_2$  (radical formé sous l'action des rayonnements UV), une molécule de provitamine A peut inactiver des centaines de molécules d'oxygène singulet. L'énergie de l'oxygène singulet est utilisée pour transformer la forme cis - du bêta-carotène en son isomère trans, et inversement.

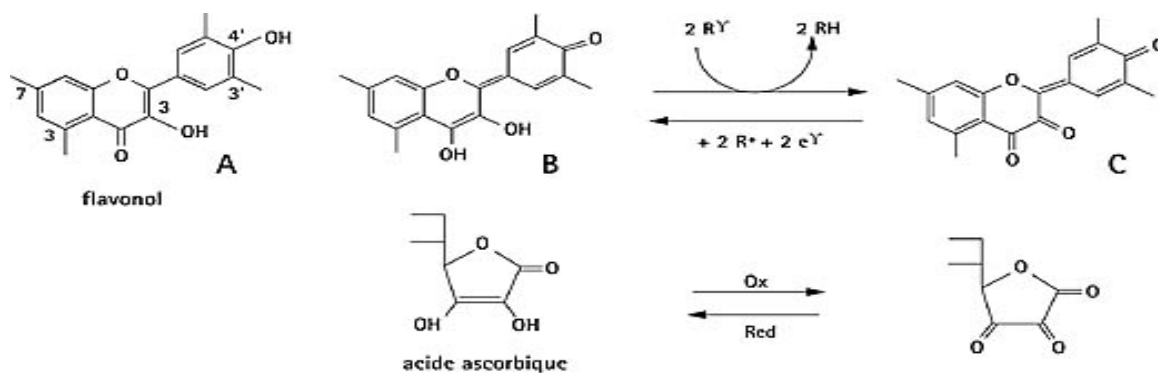
Pour l'heure, on fixe l'apport optimal en carotène à 6 mg/j ; en France, la consommation moyenne avoisine les 4 mg quotidiens.

Outre les vitamines et les pigments caroténoïdes, les tissus végétaux contiennent une énorme variété de substances phénoliques responsables de la saveur, de la couleur et de la texture des aliments. L'intérêt des scientifiques va se focaliser surtout sur les flavonoïdes en raison de leurs propriétés antioxydantes.

### 2.3.4. Les flavonoïdes

Famille de polyphénols d'origine végétale, souvent désignés sous l'étiquette <<vitamine P>>, abondants dans les légumes (oignons, pommes...), le raisin, le vin et le thé, les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs d'enzymes pro-radicalaires, régénérables par la vitamine C. Parmi les polyphénols de type flavonoïde, on trouve les flavonols qui présentent une forte analogie structurale avec la vitamine C. Les flavonols ont une structure qui leur permet de piéger les radicaux libres en les neutralisant par fixation de deux atomes d'hydrogène fournis par deux fonctions phénol. Les deux électrons célibataires créés sur la molécule de flavonol s'apparient de façon interne pour conduire à une tricétone neutre.

Celle-ci, lorsqu'elle est réduite par voie ionique, peut régénérer le flavonol initial (fig.11). Les flavonols sont ainsi des médiateurs judicieux qui permettent, grâce au couplage d'une oxydation radicalaire et d'une réduction ionique, de neutraliser les espèces radicalaires destructrices  $R^{\bullet}$  en molécules inactives neutres RH.



*Figure 11 : mode d'action antiradicalaire de la vitamine C appliqué à une molécule de flavonol*

Ils se comportent aussi comme des antioxydants vis-à-vis des LDL, et surtout, comme des protecteurs des bases de l'ADN face aux attaques radicalaires.

Les radicaux libres formés normalement dans l'organisme sont donc rigoureusement contrôlés par des systèmes antioxydants. En témoignent les recherches de ces dernières décennies : nombre de maladies associées au vieillissement cellulaire, tels le cancer, les maladies neurodégénératives seraient favorisées par un déséquilibre entre la production des radicaux libres de l'oxygène et la capacités de défense antioxydante de l'organisme.

### 3 . Pathologies

Le déséquilibre entre les systèmes de défense et de production de radicaux libres (dite balance antioxydante) entraîne un stress oxydatif.

#### 3.1 Le stress oxydatif

Les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydo-réduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces dernières préserve les cellules des effets nuisibles des radicaux libres. Quand ce précaire équilibre est rompu, en faveur des radicaux libres, il survient un stress oxydatif. On appelle stress oxydatif, une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et des bases azotées entraînant, une perte de fonction et d'intégrité, voire la mort cellulaire. Les attaques radicalaires de l'ADN peuvent être sources de mutations carcinogènes.

Deux phénomènes semblent alors être impliqués dans l'apparition d'un stress oxydant :

- d'une part, des espèces radicalaires et leurs dérivés secondaires qui se multiplient.
- d'autre part, des mécanismes anti-radicalaires qui s'essouffent c'est à dire baisse de l'activité antioxydante.

Les désordres biochimiques causés par le stress oxydant impliquent celui-ci dans de très nombreuses maladies, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une des causes de complications dans leur évolution. Un exemple caractéristique de cette situation est le SIDA où la cause initiale ne fait pas intervenir de processus radicalaire, mais la survenue secondaire d'un stress oxydant qui vient aggraver le processus initial comme dans certaines maladies. Le processus initial est l'infection virale, mais ce virus induit un stress oxydant qui réprime les gènes de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase, systèmes de défense antioxydant, entraînant la mort des lymphocytes T par apoptose.

Avec l'âge, on observe une modification de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant et de ce fait une augmentation du stress oxydant. Le stress oxydant est la principale cause initiale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardio-vasculaires etc. (tableau 1).

<ul style="list-style-type: none"><li>• Arthrite rhumatoïde</li><li>• Asthme</li><li>• Athérosclérose</li><li>• Cancers</li><li>• Cirrhose</li><li>• Colites ulcérales</li><li>• Diabète sucré</li><li>• Emphysème</li><li>• Fibrose kystique</li><li>• Fibroses pulmonaires</li><li>• Hémochromatose idiopathique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Infection au VIH</li><li>• Maladie d'Alzheimer</li><li>• Maladie de Crohn</li><li>• Maladie de Parkinson</li><li>• Sclérose latérale amyotrophique</li><li>• Mongolisme</li><li>• Syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte</li><li>• Poumon-choc</li><li>• Veines variqueuses (varices)</li><li>• Syndrome de Down</li></ul>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

*Tableau 1 : liste des maladies reliées au stress oxydatif*

Dans notre rapport nous avons choisi parmi les pathologies causées par les radicaux libres de traiter notamment le cas des cancers et des maladies neurodégénératives et plus particulièrement la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique.

### **3.2 Rôle des radicaux libres dans les maladies neurodégénératives :**

#### 3.2.1. La sclérose latérale amyotrophique :

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la plus fréquente des maladies du motoneurone. Il s'agit d'une affection dégénérative, de cause encore inconnue, qui touche des patients âgés en moyenne de 60 ans. Il y aurait en France environ 5000 à 7000 patients atteints. La maladie se présente sous deux formes : une forme bulbaire, qui est responsable de troubles de la déglutition et de la phonation, et une forme spinale avec une amyotrophie des membres inférieurs et/ou supérieurs c'est à dire paralysé de manière variable.

Plusieurs découvertes récentes ont conduit à différentes hypothèses sur les mécanismes possibles à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique. En particulier, plusieurs facteurs ont été mis en cause dont le stress oxydatif.

#### Stress oxydatif et facteurs génétiques :

Dans environ 5 % des cas, la sclérose latérale amyotrophique est une maladie familiale (elle touche plusieurs membres d'une même famille). La recherche de facteurs génétiques a permis de mettre en évidence, chez 15 % de ces formes familiales, la présence d'une mutation d'un gène situé sur le chromosome 21 : le gène de la "superoxyde dismutase Cuivre/Zinc" SOD-1, une enzyme qui intervient dans le contrôle du métabolisme de l'oxygène. En effet la mutation du gène SOD-1 occasionne une production excessive de radicaux libres et la destruction des neurones. Lors de recherches sur la SLA, des scientifiques canadiens ont relevé l'existence de niveaux excessifs de protéines endommagées par les radicaux libres à l'intérieur des neurones, ce qui laisse supposer que le neurone synthétise des niveaux excessifs de radicaux libres ou qu'il est incapable de se débarrasser de ceux qui sont produits naturellement. Cette découverte suggère donc qu'une altération du métabolisme de l'oxygène intervient dans le développement de la maladie. Un modèle animal a été mis au point : des souris qui possèdent un gène de la superoxyde dismutase déficient, et qui présentent certains symptômes de sclérose latérale amyotrophique.

On peut ainsi conclure qu'une altération du système de défense antioxydant peut contribuer à la mort neuronale et l'on peut donc considérer les radicaux libres comme la première cause de la neurodégénérescence dans la sclérose latérale amyotrophique mais uniquement dans la forme familiale.

### 3.2.2. La maladie de Parkinson :

La maladie de Parkinson est la maladie neurodégénérative la plus commune après la maladie d'Alzheimer. Son incidence est comparable selon les sexes et les niveaux culturels. Les symptômes de la maladie de Parkinson apparaissent généralement aux environs de 55-60 ans. Elle est caractérisée par une dégénérescence et une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire du cerveau (située bilatéralement, dans la partie supérieure du tronc cérébral).

Au début de la maladie les patients ont les mains ou les pieds qui tremblent, notamment lorsque les membres sont au repos. Puis leurs mouvements sont de plus en plus lents, et leurs membres de plus en plus rigides et ils coordonnent mal leurs mouvements. D'autres symptômes peuvent apparaître comme une transpiration excessive, des mouvements involontaires, des troubles psychologiques, des dépressions, voire une démence en fin de maladie.

Pour ce qui est des causes de la maladie de Parkinson et plus précisément du rôle des radicaux libres dans la maladie plusieurs hypothèses coexistent.

#### a ) Les faits neurochimiques :

Les radicaux libres sont friands des cellules nerveuses, car les membranes nerveuses ont comme constituant majeur les acides gras polyinsaturés qui se prêtent très bien à la peroxydation lipidique. Les mécanismes de défense tel que la catalase, le glutathion, le glutathion peroxydase, la vitamine E, et la transferrine sont peu représentés au niveau de la substance noire (une petite région profonde du cerveau). Ainsi dans la substance noire, le neurotransmetteur dopamine, peut être oxydée soit par la monoamine oxydase de type B soit par auto oxydation pour générer de l'eau oxygénée  $H_2O_2$ . L'  $H_2O_2$  est détoxifiée en présence de glutathion (GHS) par action de la Glutathion peroxydase (GPO). Toute augmentation du turnover de la dopamine ou toute réduction du GHS ou de GPO conduit à un excès de  $H_2O_2$  qui en présence du fer conduit à la formation d'ion hydroxyle grâce à la réaction dite de Fenton (voir 1.2.4. Radical hydroxyle).

#### b ) Le rôle des métaux :

De plus, de nombreuses études ont montré que le fer est anormalement concentré dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson. Or cet élément indispensable à la vie et au bon fonctionnement du cerveau, peut jouer un rôle nocif en stimulant la production de radicaux libres s'il est présent en excès (réaction de Fenton). Ainsi le fer pourrait être le déclencheur du stress oxydatif dans la maladie de Parkinson. La neuromélanine (pigment des cellules) serait le site d'accumulation du fer et de sa réduction en  $Fe^{2+}$ , promoteur du stress oxydatif.

On trouve également dans les granules de neuromélanine (situé au niveau de la substance noire) une accumulation d'aluminium qui augmente la peroxydation lipidique initié par le fer en déplaçant le fer de ses sites de fixation dans le cerveau.

Des travaux ont montré que la perfusion directe de fer dans la substance noire des rongeurs induit un "état parkinsonien".

Dans la maladie de Parkinson, les cellules de la substance noire sont dans un état de stress oxydatif important car le turnover de la dopamine est augmenté dans les neurones survivants et que les taux de glutathion sont réduits mais aussi parce que la concentration en fer et la peroxydation lipidique sont augmentées.

### c ) Le rôle des mitochondries

Une diminution quantitative du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été décrite dans la substance noire du parkinsonien. Ce complexe I comprend 26 peptides dont 7 sont codés par l'ADN mitochondrial. L'anomalie due aux radicaux libres aboutit à une déficience énergétique qui conduit à une diminution du blocage par le magnésium des récepteurs des acides aminés excitateurs du cerveau et à l'inactivation des mécanismes dépendants de l'ATP, l'ensemble conduisant à une accumulation de  $Ca^{2+}$  libre cytosolique, ainsi qu'à une diminution de la formation du glutathion. En définitif la production des radicaux libres conduit à la neurodégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques.

La grande question aujourd'hui est de savoir si les radicaux libres représentent le point de départ des maladies neurodégénératives où s'ils ne sont qu'une conséquence de la mort cellulaire. Toutefois, il est clair que la production de radicaux libres est une voie finale commune à d'innombrables causes, étiologiques ou pathogéniques.

## **3.3. Rôle des radicaux libres dans le cancer**

### 3.3.1 Les différentes étapes de développement d'un cancer

a ) L'initiation :

L'initiation correspond au tout premier phénomène de la transformation cancéreuse. On ne la connaît que grâce aux études expérimentales et aux études épidémiologiques, qui ont permis de faire un rapport entre les cancers et certains facteurs déclenchants.

L'initiation correspond à une modification au niveau de l'ADN, le plus souvent par mutation d'une ou de plusieurs bases de la double hélice. Sous l'effet d'un agent dit initiateur, une base de l'ADN peut être soit remplacée par une autre, soit supprimée. Ces modifications, qui pourraient conduire à un dérèglement de la cellule, se transmettent de la cellule mère à la cellule fille lorsque la cellule se divise. De plus, si la cellule fille subit également d'autres mutations, les modifications s'accumuleront de génération en génération, ce qui favoriserait le développement du cancer. Dans ce contexte, l'ADN est une cible potentielle pour les initiateurs.

Un certain nombre d'agents cancérogènes connus ont un pouvoir cancérogène en tant qu'initiateurs comme les produits chimiques, dont notamment tous les hydrocarbures polycycliques et le benzopyrène du tabac, les virus, les rayonnements X ou UV. Il est à noter que la plupart des agents cancérogènes qui sont considérés comme initiateurs produisent aussi des radicaux libres. Ceux-ci, étant très réactifs, ils déclenchent des réactions en chaîne qui peuvent endommager les cellules et ses constituants.

b ) La promotion :

On appelle ainsi la prolifération plus ou moins contrôlée des cellules initiées. En effet la plupart des agents initiateurs ne sont pas capables à eux seuls de provoquer un cancer. C'est l'accroissement du nombre de divisions cellulaires qui augmente le risque de mutations, mais aussi le risque de voir ces mutations transmises vers les cellules filles, sans réparation de l'ADN ou sans mort cellulaire programmé (apoptose).

L'agent promoteur va exercer son action pendant de nombreuses années, et ainsi faciliter la multiplication des cellules initiées. Au cours d'une des divisions ultérieures, une nouvelle mutation (ou une nouvelle initiation) aura lieu augmentant ainsi encore le dérèglement précédent.

Parmi les facteurs de promotion, on peut citer :

- la nutrition, l'alcool et certaines amines du tabac,
- les infections, les traumatismes répétés,
- les hormones pour certains cancers dits hormono-dépendants (sein, prostate, corps de l'utérus, thyroïde, etc..),

- l'âge par lui-même, parce qu'il correspond à un nombre important de divisions cellulaires, et parce que les mécanismes de réparation deviennent probablement moins efficaces.

Initiation et promotion sont des phénomènes qui se déroulent à l'échelle cellulaire et que l'on ne peut pas observer véritablement chez l'homme. Ils ont été mis en évidence expérimentalement chez l'animal (cancers expérimentaux provoqués par des substances initiatrices et promotrices).

La troisième étape du développement du cancer est la progression pendant laquelle une lésion bénigne peut devenir un néoplasme très malin à croissance rapide et en définitif donner naissance à une tumeur métastatique et donc généralisée.

Les radicaux libres sont impliqués dans le cancer et jouent le rôle de médiateur dans les phases d'initiation et de promotion du cancer.

### 3.3.2. Les radicaux libres et l'initiation :

Il a été démontré qu'un certain nombre d'initiateurs produisent des radicaux libres ou en causent la production. Ainsi les radicaux libres de l'oxygène, notamment le superoxyde de potassium et la bléomycine, deux producteurs d'anion superoxyde, peuvent causer des mutations sur les cellules mammaires.

Le peroxyde d'hydrogène, qui a été associé à l'induction du cancer chez les animaux, comme des souris, est capable de produire des dommages moléculaires qui entraîneraient la transformation des cellules. Cette substance est également réputée pour être mutagène et cancérigène. La xanthine oxydase, productrice de l'anion superoxyde, agit comme un faible agent cancérigène.

Les coupures de l'ADN, de l'un ou des deux brins, causées par des radicaux libres de l'oxygène ou par des substances cancérigènes productrices de radicaux libres. La production photochimique ou enzymatique de radicaux superoxyde entraîne une augmentation des cassures de l'ADN et des réarrangements. Le peroxyde d'hydrogène est aussi impliqué dans l'induction de dommages aux chromosomes.

### 3.3.3 Les radicaux libres et la promotion :

Le rôle des radicaux libres dans l'étape de promotion a été mis en évidence suite à un certains nombres d'observations à savoir :

- les composés qui génèrent les radicaux libres sont des promoteurs de tumeurs.
- les promoteurs stimulent la production de radicaux libres de l'oxygène.
- les promoteurs peuvent modifier les mécanismes de défense antioxydant.
- les antioxydants sont des anti-promoteurs.



Plusieurs catégories de promoteur peuvent agir par l'intermédiaire d'un mécanisme oxydant. Ils peuvent générer des radicaux libres de l'oxygène soit par une réaction chimique, soit indirectement par l'activation ou l'altération d'un processus de métabolisme de la part de la cellule elle-même, qui essaie de se défendre.

Les radicaux libres interviendraient avec l'ester de phorbol, l'un des promoteurs les plus étudiés, pour induire les coupures de l'ADN, les enjambements et les aberrations chromosomales, chez les leucocytes (globules blancs). Il semble y avoir une forte corrélation entre l'activité promotrice des di-esters de phorbol et leur habileté à stimuler la production d'espèces réactives de l'oxygène. L'espèce la plus active des esters de phorbol, le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), agit comme un fort promoteur en utilisant un mécanisme qui utilise les radicaux libres de l'oxygène. Ces radicaux libres de l'oxygène sont les composantes critiques du processus de promotion du cancer.

En lien avec sa production d'espèces réactives de l'oxygène, le TPA inhibe l'activité enzymatique antioxydante. Le traitement au TPA réduit l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et du glutathion peroxydase.

#### 3.3.4 Le rôle des antioxydants dans le cancer :

On suppose depuis longtemps que les radicaux libres ont une potentialité cancérogène et que les antioxydants ou piègeurs de radicaux libres protègent contre le cancer.

Une équipe américaine tente d'expliquer comment certains antioxydants exerceraient cet effet anticancéreux. Les cellules cancéreuses elles-mêmes pourraient être à l'origine d'une surproduction de radicaux libres. Agissant comme des messagers, les radicaux libres enverraient des signaux intracellulaires qui favorisent la prolifération incontrôlée des cellules. C'est en inhibant ces signaux que certains antioxydants pourraient prévenir le développement des cancers.

L'équipe du Dr Irani (Johns Hopkins University, Baltimore) a en effet montré que des cellules fibroblastiques transformées en cellules cancéreuses par l'expression d'un oncogène produisent de grandes quantités d'oxygène superoxyde, un radical libre.

Leurs résultats suggèrent que le radical libre est produit par les voies des protéines RAC1 (protéines de la famille des GTPases Rho activées lors de signaux cellulaires) et des flavoprotéines.

La prolifération de ces cellules est inhibée par le traitement avec un antioxydant (N-acétyl-L-cystéine). Ces résultats devraient contribuer au développement futur de stratégies thérapeutiques.

Ainsi l'Homme et les animaux ont développé des mécanismes de défenses contre les radicaux libres à savoir les antioxydants. Ces antioxydants peuvent être apporté par l'alimentation d'origine végétale. Les antioxydants alimentaires majeurs sont la vitamine E et la vitamine C. Mais beaucoup

d' autres substances, dont les nombreux pigments caroténoïdes (carotène, xanthophylles), possèdent aussi une activité antioxydante importante.

Bien qu'il soit rare de constater des symptômes évidents de déficience en vitamine E, il est vraisemblable qu'un apport supérieur à celui requis pour éviter une déficience puisse assurer une meilleure protection contre les dommages oxydatifs. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que les vitamines E, C et A ont un rôle protecteur contre le cancer.

En ce qui concerne le rôle des flavonoïdes, les constituants phénoliques sont capables d'activer des mécanismes naturels de défense anticancéreuse. En effet les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Des cellules comme les hépatocytes synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment les mono oxygénases) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat d'enzymes de phase II ( sulfotransférase etc.), qui convertissent ces produits en espèces hydrosolubles facilement éliminé par la cellule.

En ce qui concerne le rôle des vitamines et de minéraux en tant que antioxydant dans la prévention des cancers une étude est menée au près de 13.000 volontaires français : l'étude SU.VI.MAX ayant pour objectif de mesurer l'effet d'un apport supplémentaire en vitamines et minéraux antioxydants, à dose nutritionnelle, sur la santé et, particulièrement sur l'incidence des cancers, afin de pouvoir recueillir une large base de données pour l'étude des relations entre nutrition et santé.

Dans ces premières parties, nous avons découvert les radicaux libres : ce qu'ils sont, comment ils se forment, leur rôle dans notre organisme, étudié leur implication dans le cancer et dans les maladies neurodégénératives et de plus, nous nous sommes penchées sur la manière d'enrayer les radicaux libres avec des antioxydants. Pour terminer, nous allons traiter l'actualité des radicaux libres.

## **4. L'actualité**

### **4.1 Brevets**

La recherche de brevets sur le site Web de l'INPI avec le mot clé « radicaux libres » donne 286 réponses pour les années 2001 et 2002. Dans la liste suivante, nous avons choisi de vous présenter quelques exemples. Ces quelques exemples montrent des domaines de recherche variés sur les radicaux libres notamment pour le traitement du stress oxydant par de nouveaux composés dérivés de l'acide ascorbique, pour identifier et éliminer les radicaux libres par captage.

**NOUVEAUX COMPOSES SILICIÉS DERIVÉS DE L'ACIDE ASCORBIQUE, PROCÉDE DE PRÉPARATION, COMPOSITIONS LES COMPRENANT ET UTILISATIONS.**

N° de dépôt : FR9913355 Date de dépôt : 26.10.1999

Indice principal CIB : C07F-007/08

Indice secondaire CIB : A61K-007/48, A61K-007/42, A61K-007/06

Déposant(s) : L'OREAL Société anonyme

Inventeur(s) : XU JINZHU, RICHARD HERVE

L'invention concerne des nouveaux composés siliciés dérivés de l'acide ascorbique, mais concerne également des procédés pour la préparation de ces composés, les compositions notamment cosmétiques ou pharmaceutiques les comprenant, et leur utilisation en tant qu'agent antioxydant et/ou agent anti-radicaux libres, en particulier pour traiter le stress oxydant, traiter les effets de l'exposition au soleil et prévenir le vieillissement.

**COMPOSITION COSMÉTIQUE CONTRE LES RADICAUX LIBRES.**

N° de dépôt : WOEP0008729 Date de dépôt : 07.09.2000

N° de priorité : GB9921238.3 Date de priorité : 09.09.1999

Indice principal CIB : A61K-007/42

Déposant(s) : THE BOOTS COMPANY PLC

Inventeur(s) : PYKETT, Melanie, Ann, CRAIG, Ailsa, Helen, GALLEY, Edward, SMITH, Christopher

L'invention concerne des compositions cosmétiques topiques destinées à être appliquées sur la peau, comprenant un solvant ou support approprié en combinaison avec un mélange synergique composé de trois agents anti-radicaux libres sélectionnés parmi l'acide ascorbique, ses sels, esters, glucosides et glucosamines; le tocophérol et ses esters; des extraits de plantes sélectionnés parmi le ginkgo biloba, le morus alba, l'origanum vulgare, le panax ginseng, le rosmarinus officinalis, un extrait de bouleau, le camellia sinensis, la poudre de cerise des Antilles et l'huile de pépins de raisin.

**CAPTEUR DE RADICAUX**

N° de dépôt : EP99870218.7 Date de dépôt : 19.10.1999

Indice principal CIB : C07C-069/753

Indice secondaire CIB : A61K-031/215, C11D-007/54

Déposant(s) : THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

Inventeur(s) : Chiaradonna, Giuseppina, Dr., Ingrosso, Giovanni, Prof., Cicogna, Francesca, Dr., Pinzino, Calogero, Dr., Franchi, Emanuela, Dr., Del Duca, Valerio, Scialla, Stefano

La présente invention concerne un nouveau composé chromotrope, une composition de nettoyage contenant un tel composé et une méthode de test pour identifier la présence de radicaux libres utilisant ledit composé.

### **REDUCTION DES LESIONS CELLULAIRES DANS LE CORPS HUMAIN**

N° de dépôt : WOUS0147203 Date de dépôt : 03.12.2001

N° de priorité : US60/250,648 Date de priorité : 01.12.2000

US60/251,417 05.12.2000

Indice principal CIB : A61K-000/00

Déposant(s) : MORINDA, INC.

Inventeur(s) : SU, Chen, Xing, JENSEN, Claude, Jarakae, STORY, Stephen, Paul

L'invention concerne la production et l'utilisation d'un complément alimentaire permettant de réduire les lésions cellulaires dans le corps humain. Ce complément alimentaire comprend un jus de Morinda citrifolia reconstitué dérivé d'une purée de jus pur de Polynésie française, et peut comprendre d'autres jus naturels tels qu'un concentré de jus de raisin naturel, un concentré de jus de bleuet naturel et/ou un autre concentré de jus naturel. Ledit complément alimentaire comprend une combinaison de composés agissant au niveau cellulaire de manière à intensifier la fonctionnalité positive des cellules dans le corps, y compris la régénération cellulaire et la fonction cellulaire, ce qui permet d'augmenter la capacité des cellules à absorber et utiliser des substances nutritives telles que les vitamines et les minéraux. Par ailleurs, ce complément alimentaire permet de récupérer les hydroperoxydes lipidiques et les radicaux libres des anions superoxyde dans le corps, d'où une réduction des lésions cellulaires.

### **PROCEDES DE REDUCTION DE NIVEAUX DE RADICAUX LIBRES IN VIVO ET COMPOSITIONS SERVANT CET OBJECTIF**

N° de dépôt : WOUS0130306 Date de dépôt : 26.09.2001

N° de priorité : US09/672,140 Date de priorité : 27.09.2000

Indice principal CIB : A61K-031/325

Indice secondaire CIB : A61K-031/28, A61K-031/40, A61K-031/435, A61K-031/55

Déposant(s) : MCW RESEARCH FOUNDATION, INC.

Inventeur(s) : LAI, Ching-San

L'invention concerne des procédés de réduction in vivo des niveaux de radicaux libres chez des sujets mammifères qui le requièrent. Contrairement à l'approche inhibitrice décrite dans l'art antérieur (par exemple, selon laquelle la fonction de l'espèce responsable de la production de radicaux libres est inhibée), la présente invention propose une approche de captage par laquelle les radicaux libres produits en surnombre sont liés in vivo à des capteurs de radicaux libres. Par exemple, le capteur de radicaux libres envisagé pour mettre en application cette invention sera le complexe de fer dithiocarbamate-ferreux. Ce complexe se lie aux radicaux libres, formant un complexe stable contenant les radicaux libres et soluble dans l'eau. Lorsque ce complexe sera administré à un sujet atteint de trouble associé à la surproduction de radicaux libres, le complexe contenant les radicaux libres et soluble dans l'eau est produit puis filtré par les reins, concentré dans l'urine et éventuellement excrété par le sujet, réduisant ainsi les niveaux de radicaux libres in vivo.

## **4.2 Thèses, centres de recherche et firmes pharmaceutiques :**

### 4.2.1. Les thèses

La recherche de thèses sur le SUDOC avec le mot clé « radicaux libres » donne 269 réponses. Dans la liste qui suit nous avons choisi de vous présenter quelques exemples.

Martine Laplace, **Radicaux libres et maladie de Parkinson** / 1996 BORDEAUX2-BU Santé

Frédérique Depert, **Les médicaments anti radicaux-libres** / [1994] GRENOBLE1-BU Médecine pharm.

Sylvia Cerou, **Radicaux libres et pathologie humaine: actualisation et perspectives d'avenir** / [s.n.] / 1994 LIMOGES-BU Médecine pharmacie

Aline Evrard, **Radicaux libres et cancers : généralités, rôles dans la carcinogénèse et prévention par antioxydants** / [s.n.] / 2001 LILLE2-BU Santé-Recherche

Frédéric Clause, **Radicaux libres et molécules à activité antioxydante** / [s.n.] / 2001 MAISONS-ALFORT-Ecole Vétérinaire.

### Thèmes de recherche :

En France, d'innombrables activités de recherche portent sur les radicaux libres, les antioxydants et l'implications des radicaux libres dans les différentes pathologies dans des laboratoires de recherche

spécialisés ou non sur les radicaux libres. A titre d'exemple nous avons choisi de vous présenter plus particulièrement deux d'entre eux :

- **INRA**

Pour confirmer les effets protecteurs des polyphénols contre les radicaux libres, l'INRA étudie la biodisponibilité des différents polyphénols présents dans les aliments, et la nature des métabolites présents dans les tissus (c'est à dire la nature des sous-produits de la transformation des polyphénols dans le corps humain). Ces études ont un double intérêt : d'une part préciser les mécanismes à l'origine de l'effet protecteur des polyphénols, d'autre part utiliser les métabolites comme biomarqueurs de consommation. De tels biomarqueurs constituent un outil indispensable pour préciser, dans le cadre d'études épidémiologiques, les associations entre consommation en polyphénols et protection contre les pathologies. Ce sont de telles études qui devraient permettre notamment de définir les niveaux d'apport optimaux de polyphénols à l'échelle de populations.

- **LABORATOIRE DE CHIMIE THERAPEUTIQUE** (faculté de pharmacie de Strasbourg).

Le laboratoire recherche entre autre le pouvoir capteur de radicaux libres de différents composés.

- **Capteurs de radicaux libres**

Au laboratoire, différents modèles chimiques, enzymatiques et photochimiques ont été mis au point pour évaluer le pouvoir capteur. En ce qui concerne le radical hydroxyle et l'oxygène singulet, les méthodes permettant de calculer les constantes de vitesse de leurs réactions avec les capteurs ont été établies et validées. Elles sont basées sur le principe de compétition faisant intervenir une molécule détectrice.

- **Flavonoïdes et dérivés**

L'étude de la capture des radicaux libres, anion superoxyde (dans un modèle hypoxanthine/Xanthine oxydase) et radical hydroxyle (dans un modèle basé sur la réaction de Fenton) par des dérivés hémisynthétiques, mono ou polyalkylés de la rutine et de la quercétine ont permis de déterminer les éléments structuraux essentiels à la désactivation des radicaux libres.

Plus les hydroxyles phénoliques sont substitués, plus le pouvoir capteur de radicaux est élevé. Ceci s'explique par le fait qu'à pH physiologique en présence de fer, les flavonoïdes, contenant des fonctions phénoliques libres, produisent eux-mêmes des radicaux hydroxyles par un mécanisme impliquant le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde.

Ainsi, les flavonoïdes ne doivent plus être considérés, a priori, comme antioxydant, dans certaines conditions ils peuvent être pro-oxydant.

L'étude de la désactivation des radicaux peroxylipidiques a été entreprise afin de compléter cette relation structure-activité.

#### 4.2.2 Les centres de recherche hors France

Il existe des centres de recherche spécialisés dans l'étude des radicaux libres hors de la France, en voilà deux exemples :

- **Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement** (anciennement : Centre de Biochimie de l'Oxygène, CBO) à l'Université de Liège, unité originale fondée par Carol Deby, médecin praticien, où la biochimie de l'oxygène est étudiée sous tous ses aspects.

- **Free Radical Research** à l'Université de Brunel (Londres) lié à l'association Society for Free Radical Research International qui s'intéresse à tous les aspects de recherche liés aux radicaux libres dans n'importe quel domaine scientifique.

#### 4.2.3 Les firmes pharmaceutiques

De nombreuses firmes pharmaceutiques travaillent sur les radicaux libres, mais très peu ont une activité reliée au stress oxydatif :

- **Genox Corp**

Genox est une compagnie biotechnologique qui se consacre au développement et à l'application des techniques de détection du stress oxydant humain non-invasif dans les domaines suivants : Médecine du sport, Diagnostic médical, Recherches scientifiques, Nutrition et produits agricoles, Évaluation de Nutrition et de Régime, Stratégies Médicales Préventives, Études épidémiologiques, Evaluation des risques du vieillissement accéléré et optimisation individuelle d'envergure de santé.

- **Oxis International, Inc**

OXIS international (OTCBB aux Etats-Unis et Nouveau Marché en France : OXIS) se concentre sur le développement de technologies et de produits pour rechercher, diagnostiquer, traiter et empêcher les maladies liées aux dommages des radicaux libres et à l'espèce réactive de l'oxygène - les maladies du stress oxydant.

- **Incaria Pharmaceuticals**

Incara Pharmaceuticals Corporation développe une série d'antioxydants catalytiques comme traitements pour la protection contre des dommages se produisant dans la thérapie radiologique du cancer et pour la protection des cellules dans la transplantation.

Incara explore également les effets protecteurs de ces antioxydants catalytiques dans les maladies pulmonaires et comme agents réducteurs de la toxicité résultant de l'exposition totale de corps au rayonnement, identique à celle qui se produirait dans une attaque nucléaire d'accidents ou de terroriste.

### **4.3 Salons et conférences**

Il n'existe pas de salon à notre connaissance portant particulièrement sur les radicaux libres ou les antioxydants mais d'autres salons traitant de sujets variés comme l'alimentation Bio, la nutrition ou bien encore la santé présentent des conférences ou ateliers portant plus spécifiquement sur les radicaux libres. Nous avons choisi de vous présenter quelques salons qui vont se tenir tout au long de l'année 2003 :

#### **Marjolaine**

Du 8 au 16 novembre 2003

#### **Rentrez Zen !**

Du 9 au 13 octobre 2003

Compléments alimentaires : vitamines, minéraux, oligo-éléments.

#### **Vivre Autrement Bio & Nature**

Du 27 février au 3 mars 2003

#### **Life<sup>2</sup>, le salon santé et mieux-vivre** au Brussels Expo - Bruxelles

Du 14 au 16 mars 2003

Débat : "Vieillir jeune et en bonne santé"



## Conclusion

Il existe donc un équilibre critique entre l'oxygène moléculaire indispensable à la vie en aérobiose et la formation inévitable de radicaux oxygénés libres au cours de son utilisation par le métabolisme cellulaire, que l'organisme doit s'efforcer de maintenir pour conserver son intégrité. L'exposition à des sources liées à l'environnement et à l'âge peuvent rompre cet équilibre entraînant une augmentation du stress oxydatif. Conséquences : les effets toxiques des radicaux libres se manifestent par une altération des molécules biologiques qui endommagent les cellules et entraînent leur perte de fonction ou d'intégrité et causent la mort cellulaire. Ils ont pour site privilégié des constituants cellulaires essentiels tels que les phospholipides membranaires, l'ADN et certaines liaisons chimiques des protéines. Les altérations moléculaires que les radicaux libres sont capables de provoquer au sein des cellules et de la plupart des structures tissulaires expliquent leur contribution majeure dans les phénomènes dégénératifs et de cancérisation (fig. 12).

On peut considérer l'action des radicaux libres comme étant la première cause de la neurodégénérescence. Une accumulation de fer ou une diminution de l'activité des enzymes antioxydants dans le cerveau peut causer un état de stress oxydatif qui induit les maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson.

Les radicaux libres sont aussi impliqués dans le cancer et jouent le rôle de médiateur dans les phases d'initiation et de promotion.

Produits en permanence, les radicaux libres sont, pour la plupart, détruits par les diverses défenses antioxydantes de l'organisme, naturellement, constitués d'enzymes et de vitamines.

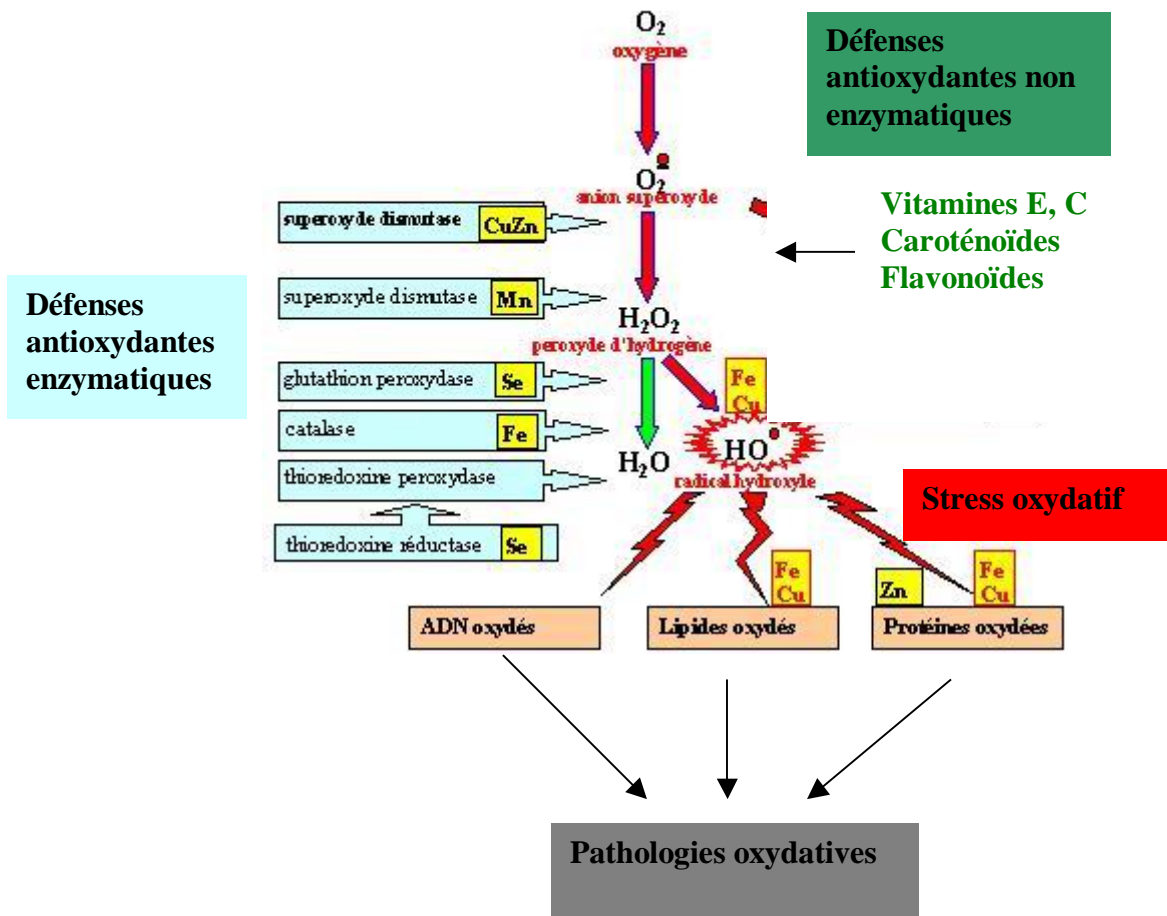
Donc de façon directe ou non, la production de radicaux libres joue un rôle essentiel dans le processus de vieillissement et les pathologies oxydatives. On sait que le risque de stress oxydant augmente avec l'âge, d'autant que les apports, la biodisponibilité et le statut en micronutriments antioxydants diminuent. Une stratégie de prévention nutritionnelle apparaît donc comme un enjeu de santé publique. En fait le moyen le plus simple consiste à avoir une alimentation variée et équilibrée, combinant vitamines, minéraux et oligo-éléments antioxydants.

Dans divers domaines de la biologie, on cherche à freiner ces processus de vieillissement :

- en développant des agents antioxydants efficaces capables de freiner l'accumulation des lésions oxydatives et des mutations ;
- en créant des molécules capables d'interférer avec les circuits métaboliques génétiquement défectueux.

- les agents environnementaux toxiques et mutagènes les plus actifs étant les radicaux libres de l'oxygène générés dans chaque cellule, au nombre des moyens prévisibles de lutte contre les effets du vieillissement, on peut espérer un progrès important dans la lutte contre les radicaux libres, et, pour certaines pathologies, peut-être des techniques de thérapie génique appliquées aux pathologies du vieillissement.

Mais à l'avenir, les perspectives de prévention envisagées sont liées aux progrès des biotechnologies; en particulier celles qui visent à détecter précocement, ou même à corriger, les mutations portées par les lignées germinales. Elevées au rang de thérapies, ces biotechnologies poseront des problèmes sociaux et éthiques au médecin.



*Figure 12 : un équilibre fragile*

# Bibliographie

## Dictionnaires, glossaires et ouvrages de référence

- Encyclopédie Universalis, volume 19, Radicaux libres, p332-333
- Fossey, Jacques, Les radicaux libres en chimie, Masson, 1993, p.
- L. Parker, A.N.Glazer, Oxygen Radicals in Biological Systems Part B Oxygen Radicals and Antioxidants, Methodes in Enzymology volume 186, 1990, 855p.

## Articles

- C. DEBY, *La Biochimie de l'oxygène*, **La Recherche**, n° 228, janv. 1991, p.56-64
- P.RIEDERER, M.YOUDIM, *Maladie de Parkinson*, **Pour la science**, n° 233, mars 1997, p.60-67
- A-M. ROUSSEL, *Des pièges à radicaux libres*, **Science et Vie**, n° HS 208, sept. 1999, p.78-85
- I.JOHNSON, *Antioxydants et anticancéreux*, **Biofutur**, n° 186, fév. 1999, p.14-17
- H. ALLAIN, *Pharmacologie des radicaux libres : application à la dégénérescence*. -**Laboratoire de pharmacologie expérimentale et clinique**, 1999 , cours.
- J.C.DESPORT, F. MAILLOT, *Nutrition et sclérose latérale amyotrophique*. -**Nut Clin Métabol**, 2002;16 : 91-6.

## Journaux scientifiques consacrés aux radicaux libres

Free Radical Biology and Medicine

Free Radical Research

## Sites Internet

### *a. Sites internet génériques*

**Site de pharmacologie** Available from internet <URL : [http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Oxygene\\_reactions\\_radicalaires3.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Oxygene_reactions_radicalaires3.php) [visité le 20/01/03] >

**Pharmacothérapie théorique.** Available from internet <URL : [http:// www.pharmactuel.com/sommaires/200005/67-74.pdf](http://www.pharmactuel.com/sommaires/200005/67-74.pdf) [visité le 20/01/03] >

**Fondation recherche médicale.** Available from internet <URL : <http://www.frm.org/cgi-bin/htsearch.cgi> [visité le 20/01/03] >

*b. Sites internet spécialisés*

**Site de l'association Society for Free Radical Research International** Available from internet <URL : <http://www.sfrr.org/> [visité le 20/01/03] >

**Portail vers de nombreux sites traitant le sujet** Available from internet <URL : <http://www.lehms90.ca/sante/radicaux.htm> [visité le 20/01/03] >

**La Sclérose Latérale Amyotrophique.** Available from internet <URL : <http://iquebec.iffrance.com/info-sla/liens3.html> [visité le 20/01/03] >

**Le Stress Oxydant dans les Maladies Humaines.** Available from internet < URL : <http://www2.ujf-grenoble.fr/pharmacie/laboratoires/lbso/Pub/stress/maladie.htm> [visité le 20/01/2003] >

**Maladie de Parkinson.** Available from internet <URL : <http://www.chu-rouen.fr/ssf/pathol/parkinsonmaladie.html> [visité le 20/01/03] >

**La toile du Quebec .** Available from internet <URL :[http://www.toile.qc.ca/quebec/Sciences\\_et\\_sante/Sante/Maladies/](http://www.toile.qc.ca/quebec/Sciences_et_sante/Sante/Maladies/) [visité le 20/01/03] >

**Les radicaux libres : une question d'équilibre.** Available from internet <URL : <http://www3.sympatico.ca/diane.demers/> [visité le 20/01/03] >

**Chroniques cyberradicalaires.** Available from internet <URL : <http://www.cam.org/%7Ebabos/ros.htm> [visité le 20/01/03] >

*c. Brevets en ligne* Available from internet <URL : [www.inpi.fr](http://www.inpi.fr) ou [www.espacenet.com](http://www.espacenet.com) [visité le 20/01/03] >

*d. Thèses* Available from internet <URL : [www.sudoc.abes.fr](http://www.sudoc.abes.fr) [visité le 20/01/03] >

*e. Centres de recherche sur les radicaux libres*

**Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement.** Available from internet <URL : <http://www.ulg.ac.be/cord/> [visité le 20/01/03] >

**Free Radical Research.** Available from internet <URL : <http://www.brunel.ac.uk/org/sfrr/> [visité le 20/01/03] >

**Laboratoire de chimie thérapeutique.** Available from internet <URL : <http://www-fac-pharma.u-strasbg.fr/Doc/Fr/Rech/therapeutique.html> [visité le 20/01/03] >

**INRA** Available from internet <URL : <http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/PRESSE/COMMUNIQUEES/sial2000/txt2.htm> [visité le 20/01/03] >

*f. Firmes pharmaceutiques dont l'activité est reliée au stress oxydatif*

**Genox Corp** Available from internet <URL : <http://www.genox.com/> [visité le 20/01/03] >

**Oxis International, Inc** Available from internet <URL : <http://www.oxis.com/> [visité le 20/01/03] >

**Incaria Pharmaceuticals** Available from internet <URL : <http://www.incara.com/> [visité le 20/01/03] >

*g. Groupes de discussion présentant des intérêts au sujet des radicaux libres*

**Archives du forum de discussion bionet.molecules.free-radicals** Available from internet <URL : <http://www.bio.net/hypermail/FREE-RADICALS/> [visité le 20/01/03] >

Cancers : [sci.med.diseases.cancer](http://sci.med.diseases.cancer)

Sclérose latérale amyotrophique : [sci.med.diseases.als](http://sci.med.diseases.als)