

Stress oxydant

Quelles sont les propriétés chimiques des espèces réactives de l'oxygène ?
Comment détecter les espèces réactives de l'oxygène *in vitro* et *in vivo*?

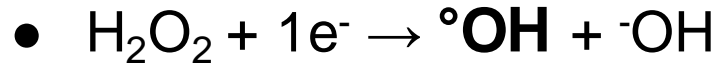
Plan

1. Formes réactives de l'oxygène.
1. Détection in vitro
1. Détection in vivo

L'oxygène et ses formes réactives

L'oxygène sous forme O₂, est un gaz indispensable à la vie pour de nombreuses espèces.

Ils existent des formes dites toxiques, appelés ERO soit espèces réactives de l'oxygène.



Potentiel standard

$^{\circ}\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ possède le potentiel standard le plus élevé (2,34 V)

$\text{O}_2/\text{O}_2^{\circ-}$ - possède le potentiel le plus faible des ERO avec un potentiel de (- 0,33 V)

Le superoxyde appartient également au couple $\text{O}_2^{\circ-}/\text{H}_2\text{O}_2$, de potentiel standard (0,93V)

Couple Ox/Red	Nombre d'électron(s)	E° (Volt)
$\text{O}_2/\text{O}_2^{\circ-}$	1	- 0,33
$\text{O}_2^{\circ-}/\text{H}_2\text{O}_2$	1	0,93
$\text{H}_2\text{O}_2/^{\circ}\text{OH}$	1	0,30
$^{\circ}\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$	1	2,34
$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$	2	0,30
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	2	1,34
$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	4	0,81

Vitesse de réaction, stabilité

Réactions chimiques classiques : 10^{-2} et $10^2 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$ \longrightarrow nécessite un apport en énergie.

$^{\circ}\text{OH}$ avec les substrats biologiques : 10^8 et $10^{10} \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$

- Faible durée de vie 10^{-6} s \longrightarrow ne se diffuse quasiment pas au sein des milieux biologiques, réagit sur le lieu même de sa production.
 - Toxicité extrême

$\text{O}_2^{\circ-}$ avec les substrats biologiques : $<10^2 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$

- Dismutation de $\text{O}_2^{\circ-}$: $6.10^5 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$ à $\text{pH}=7$ à l'aide du SOD
 - Formation de H_2O_2

Espèces réactives de l'Oxygène (ERO)

Formation des espèces au cours du processus de réduction :

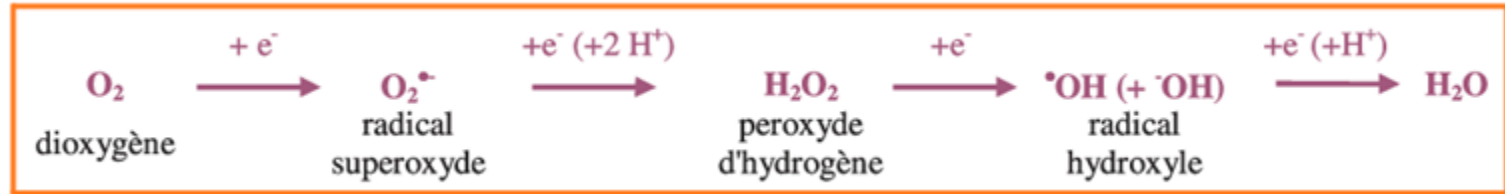
- $O_2^{\cdot -}$: **Radical anion superoxyde.**
- H_2O_2 : **Peroxyde d'hydrogène.**
- $\cdot OH$: **Radical hydroxyle.**

Intermédiaires réactifs ou activés de l'oxygène \longrightarrow Beaucoup plus réactif que l'oxygène.

Mauvaise régulation de ces espèces = Déséquilibre => **STRESS OXYDANT**.

Production enzymatique

Réaction globale de réduction de l'oxygène :



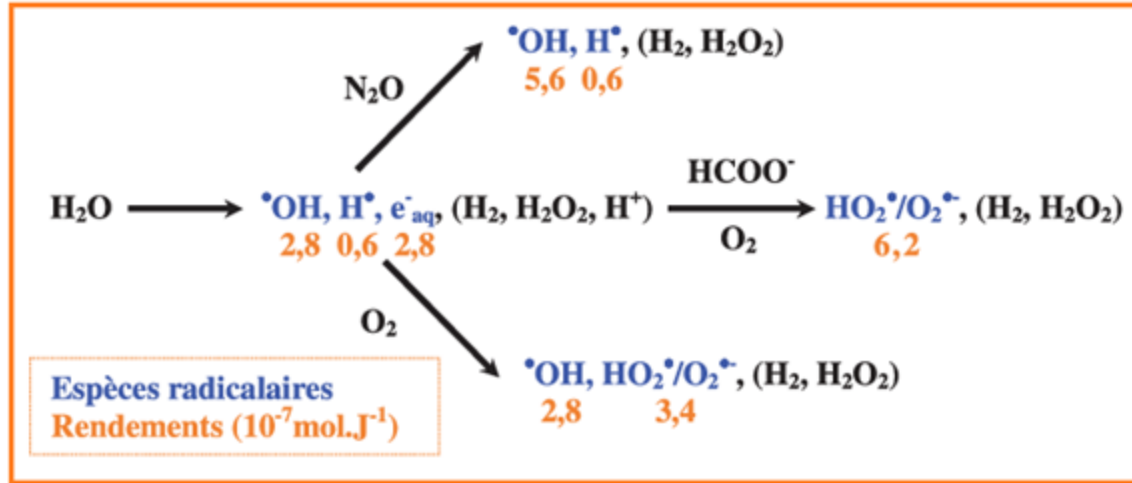
- 2% de l'oxygène subit une réaction mono électronique : $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$

- Régulation par la SOD : $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{SOD, 2 H^+} H_2O_2 + O_2$

- Réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + Fe^{3+} + ^-OH$

Radiolyse de l'eau

Etudes physico-chimique des phénomènes radicalaires.



Rendement radiolytique :

$$Rdt = \frac{n}{E}$$

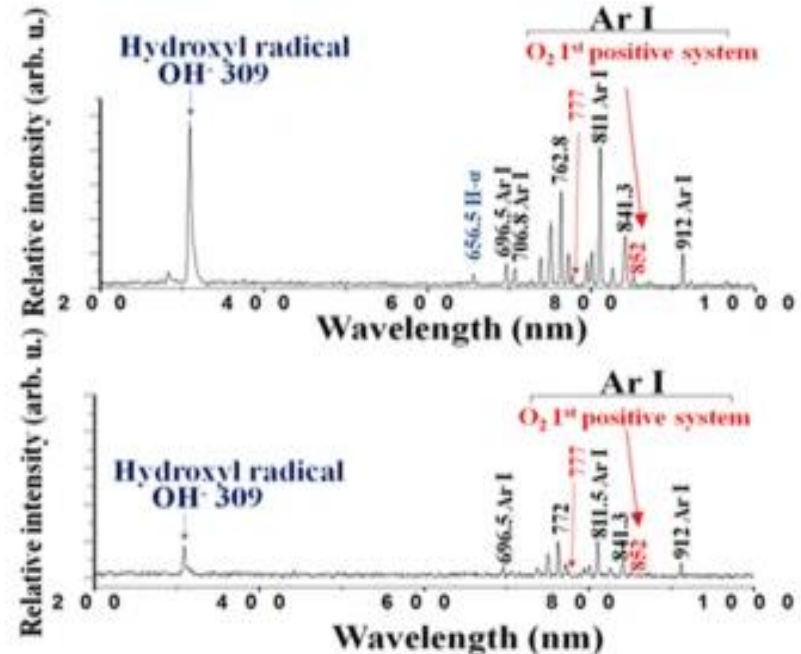
n : Nombre de moles formées.

E : Energie absorbée par mole.

Détection des radicaux libres (in vitro)

Détection du radical hydroxyle (HO•) par méthode directe

- Méthode de détection exigeant des conditions particulières
- Spectrophotométrie d'absorption induisant fluorescence entre 305 et 315 nm
- Désactivation non radiative 1000 fois plus importante que l'émission de fluorescence
- Sensibilité très faible et soumis à des perturbations



Détection du radical hydroxyle (HO•) par méthode indirecte

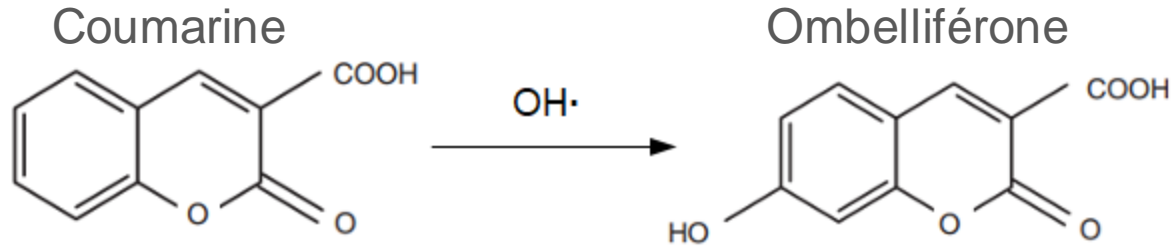
La méthode indirecte de détection des radicaux consiste à piéger le radical étudié par une sonde pour former un produit stable et quantifiable par fluorescence.

Une bonne sonde doit satisfaire les conditions suivantes :

- concentration en produit final proportionnelle à la quantité de HO• formée
- sélectivité vis-à-vis de HO• la plus grande possible
- réactions avec les autres espèces réactives susceptibles d'accompagner HO• établi
- produit final étudié stable chimiquement pour observation sur des temps longs

Détection du radical hydroxyle (HO•) par méthode indirecte

La méthode est basée sur la réaction du radical hydroxyle avec un composé aromatique dont le produit fluoresce après irradiation (662 keV).



Pourcentage de produit fluorescent formé par HO• : 5-11%

Forte fluorescence bleue de l'Ombelliférone (émission à 450 nm)

Ordre de grandeur constantes de réaction : 2×10^9 - 2×10^{10} L/mol/s

Inconvénient :

Le radical hydroxyle peut réagir avec tous les aromatiques qu'il rencontre, cette méthode ne peut donc pas être utilisée en milieu cellulaire.

Détection des radicaux libres (in vivo)

Pour détecter et piéger les radicaux libres dans les systèmes biologiques, il est nécessaire d'utiliser des molécules capables de les capturer à l'intérieur des cellules.

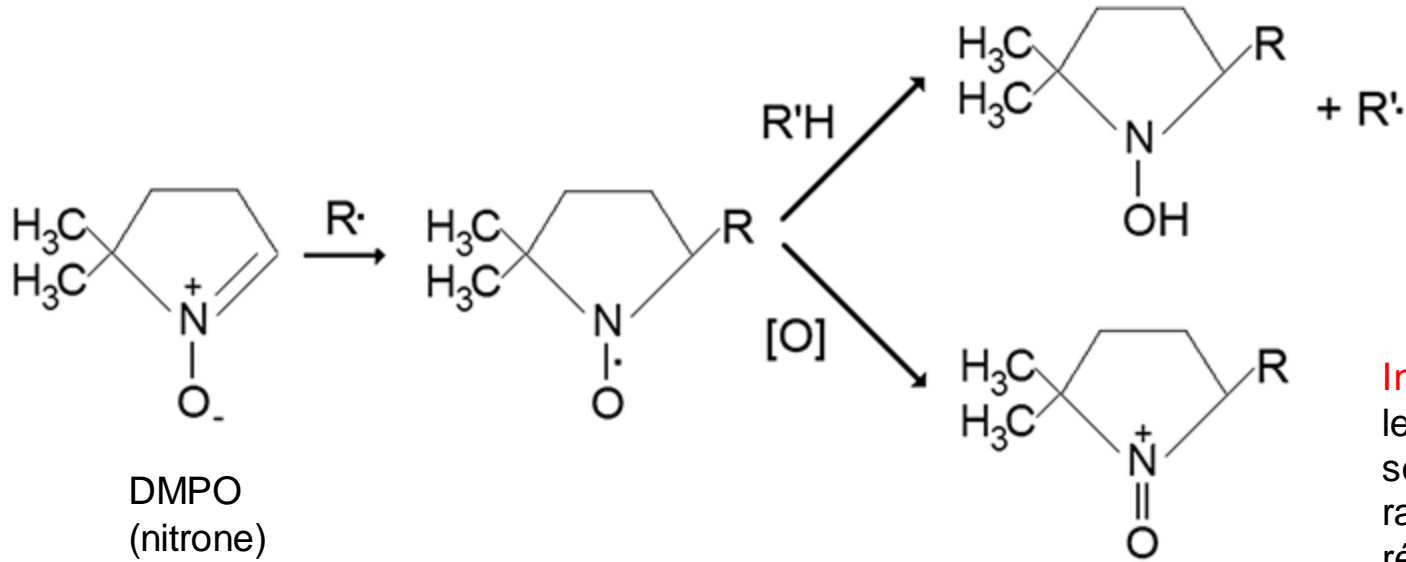
Cette capture peut être réalisée au moyen d'un agent de piégeage ou en utilisant des anticorps spécifiques.

Exemples pour détection:

- 1. Spin Trapping et Spectroscopie ESR/RPE**
- 2. Immuno-Spin tapping**
- 3. Détection Combinée IST et mMRI**

Spin Trapping et Spectroscopie ESR/RPE

Les agents de piégeage de spin (nitrones) peuvent être utilisés pour piéger les composés radicaux libres (R·) afin de former un adduit de spin (nitroxyde ou aminoxyde), détecté ensuite par spectroscopie RPE.

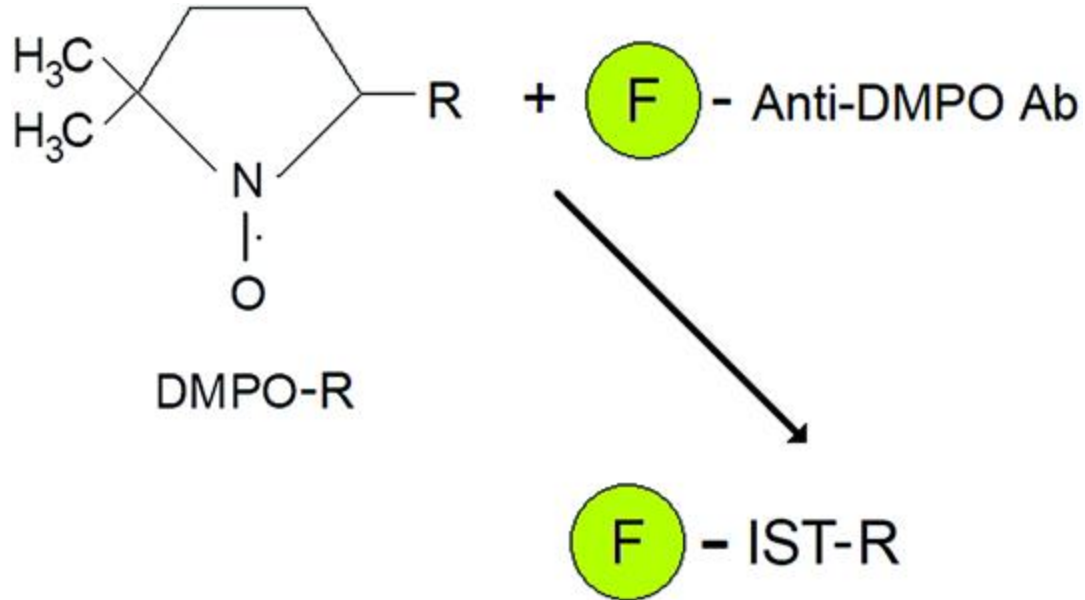


DMPO
(nitron)

Inconvénient :
les agents de piégeage sont de courte durée en raison des processus réducteurs et/ou oxydatifs dans les systèmes biologiques.

Immuno-Spin tapping (IST approach)

L'anticorps anti-DMPO est attaché à un colorant fluorescent, ce qui permet la détection in vitro des adduits radicaux DMPO piégés.



Avantage:

L'anticorps qui reconnaît le adduit de spin DMPO, quel que soit l'état oxydatif/réducteur des adduits radicaux piégés

Détection Combinée IST et mMRI (in vivo)

Un agent: DMPO capture les radicaux libres.

En parallèle, une sonde IRM, **la sonde anti-DMPO**, est administrée.

Elle intègre un anticorps ciblant les adduits radicaux du DMPO ainsi qu'un agent de contraste IRM, facilitant ainsi la détection spécifique des adduits radicaux libres.

