

Stress oxydant

Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène

M. Gardès-Albert

Résumé. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO), en particulier les radicaux hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$) et superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont impliqués dans tous les phénomènes de stress oxydant. Ce dernier se manifeste lors de nombreux désordres pathologiques tels que, par exemple, les maladies cardiovasculaires, le diabète ou les maladies neurodégénératives.

La connaissance des propriétés thermodynamiques (potentiels standard d'oxydo-réduction) et cinétiques (constantes de vitesse) des ERO permet de dresser un panorama rigoureux de la réactivité chimique de ces espèces. Les radicaux hydroxyles ($^{\circ}\text{OH}$) sont des oxydants puissants (espèces très toxiques) qui attaquent toutes les cibles moléculaires biologiques (ADN, protéines, lipides...), en donnant naissance à d'autres radicaux libres localisés sur les cibles elles-mêmes. Les radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\circ-}$) ont, quant à eux, une réactivité beaucoup plus nuancée, puisqu'ils ne réagissent pas directement avec les macromolécules biologiques. Cependant, une certaine toxicité leur est attribuée *via* des réactions radicalaires secondaires. D'autres radicaux libres (de types peroxyde RO_2° et alkoxyde RO°), appartenant également à la famille des ERO, participent, en les amplifiant, aux phénomènes de stress oxydant.

Mots-clés : Constante de vitesse, Potentiel d'oxydo-réduction, Radical hydroxyle, Radical superoxyde.

Summary. Reactive Oxygen Species (ROS), namely hydroxyl ($^{\circ}\text{OH}$) and superoxide ($\text{O}_2^{\circ-}$) free radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2), are involved in all oxidative stress phenomena. These latter occur in numerous pathological disorders such as, for example, cardiovascular diseases, diabetes or neurodegenerative diseases.

Knowledge of thermodynamic (reduction potentials) and kinetic (rate constants) properties of ROS allows to draw up a rigorous overview of the chemical reactivity of these species. Hydroxyl free radicals ($^{\circ}\text{OH}$) are powerful oxidants (very toxic species) which attack all the biomolecular targets (DNA, proteins, lipids...), giving other free radicals localized on the targets. Superoxide free radicals ($\text{O}_2^{\circ-}$) have a more graduated reactivity, since they don't directly react with biological molecules. However, some toxicity would be attributed to them via secondary radical reactions. Other free radicals (of peroxy RO_2° and alkoxy RO° types), belonging also to the ROS family, contribute by enhancement to oxidative stress.

Key-words: Hydroxyl radical, Reduction potential, Rate constant, Superoxyde radical.

Physico-chemical aspects of reactive oxygen species.
M. Gardès-Albert. *Ann Pharm Fr* 2006, 64: 365-372.

Introduction

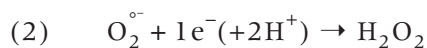
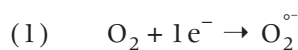
Il est maintenant reconnu que de nombreux désordres pathologiques impliquent, à un degré

plus ou moins important, le stress oxydant [1, 2]. Celui-ci est caractérisé par l'intervention d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des espèces chimiques dérivant du dioxygène O_2 , par réduc-

Laboratoire de chimie-physique, UMR 8601 Cnrs-Université Paris 5, UFR Biomédicale des Saint-Pères, 45, rue des Saint-Pères, F 75270 Paris Cedex 06.

Correspondance : M. Gardès-Albert, à l'adresse ci-dessus.

tion. C'est ainsi que le radical¹ superoxyde ($O_2^{\circ-}$) provient formellement de l'addition d'un seul électron sur le dioxygène [réaction (1)], tandis que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) résulte de l'addition de deux électrons sur le dioxygène et par conséquent de l'addition d'un seul électron sur le radical superoxyde [réaction (2)]. Quant au radical hydroxyle ($^{\circ}OH$), il est le produit de la réduction du peroxyde d'hydrogène par un seul électron [réaction (3)]. Les espèces $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 et $^{\circ}OH$ constituent les protagonistes majeurs du stress oxydant. Les sources cellulaires de ces ERO sont principalement d'origine mitochondriale (chaîne respiratoire) [3], mais elles peuvent également provenir de divers processus métaboliques comme par exemple la transformation de certains xénobiotiques par les systèmes enzymatiques de type cytochrome P_{450} [4].



Alors que le dioxygène qui a donné naissance à ces espèces est chimiquement peu réactif, les ERO possèdent une réactivité chimique qui leur est propre et qui est, le plus souvent, délétère vis-à-vis des biomolécules. La connaissance de leurs propriétés physico-chimiques, c'est-à-dire de leurs propriétés thermodynamiques et cinétiques, permet de mieux comprendre la réactivité chimique au niveau moléculaire de ces entités. Il est alors possible de prévoir le rôle potentiellement toxique que les ERO peuvent jouer dans de nombreux désordres pathologiques [5] comme les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le diabète, les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer...), le cancer, ainsi que dans les processus de vieillissement.

Propriétés thermodynamiques

La spontanéité thermodynamique d'une réaction chimique est donnée par la valeur algébrique de

¹ Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire (non apparié) sur sa couche périphérique. Dans le cas des ERO, l'électron célibataire se trouve sur l'atome d'oxygène. Il est représenté par un point, en exposant du symbole chimique O.

sa variation d'enthalpie libre standard (ΔG°)². Lorsque la réaction chimique est une réaction d'oxydo-réduction, comme c'est le cas pour les réactions impliquant des radicaux libres, la variation d'enthalpie libre standard est reliée aux potentiels standard des couples mis en jeu ($\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ}$, n étant le nombre d'électrons échangés, F la charge d'une mole d'électrons (96 500 Coulomb) et ΔE° la différence entre le potentiel standard du couple oxydant ($E^{\circ}_{\text{couple Ox}}$) et celui du couple réducteur ($E^{\circ}_{\text{couple Red}}$). La spontanéité thermodynamique ($\Delta G^{\circ} < 0$) peut alors être corrélée à la variation de potentiel standard de la réaction d'oxydo-réduction ($\Delta E^{\circ} > 0$). Remarquons que $\Delta E^{\circ} > 0$ résulte de la supériorité de $E^{\circ}_{\text{couple Ox}}$ devant celle de $E^{\circ}_{\text{couple Red}}$ ($E^{\circ}_{\text{couple Ox}} > E^{\circ}_{\text{couple Red}}$).

Les principaux couples d'oxydo-réduction (Ox/Red) des ERO, ainsi que leurs potentiels standard à pH = 7 (E° Ox/Red) sont rassemblés dans le *tableau I*. Les valeurs de E° , élevées (et positives), traduisent un pouvoir oxydant important, tandis que les valeurs de E° négatives impliquent un effet réducteur.

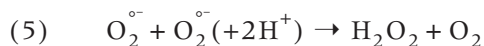
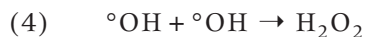
Le potentiel standard le plus élevé (2,34 V.) (*tableau I*) caractérise le couple $^{\circ}OH/H_2O$ et traduit le grand pouvoir oxydant du radical hydroxyle, par échange d'un seul électron. En effet, parmi les ERO, le radical $^{\circ}OH$ est celui qui, thermodynamiquement, est le plus avide d'électron. Il est capable d'oxyder tout réducteur appartenant à un couple dont le potentiel standard est inférieur à 2,34 V., ce qui est le cas de la majorité des composés bio-organiques (l'inégalité $E^{\circ} \text{ } ^{\circ}OH/H_2O > E^{\circ} \text{ Ox/Red}$, implique la réaction spontanée de $^{\circ}OH$ avec Red).

L'espèce la plus réductrice est le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$ (-0,33 V.) (*tableau I*). Celui-ci est donc susceptible d'être oxydé en dioxygène par tout oxydant appartenant à un couple dont le potentiel standard est supérieur à -0,33 V. Remarquons que le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$ peut également être oxydant (0,93 V.) (*tableau I*) en donnant naissance à du peroxyde d'hydrogène.

² Lorsque ΔG° est négatif la réaction est spontanée (des réactifs vers les produits), tandis que lorsque ΔG° est positif, la réaction ne l'est pas (mais elle peut se produire en sens inverse, c'est-à-dire des produits vers les réactifs).

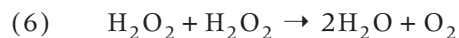
Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène

Une autre propriété importante des radicaux libres est leur capacité à réagir entre eux. Cette propriété peut être directement déduite des potentiels standards. Par exemple, le radical hydroxyle réagit sur lui-même pour former du peroxyde d'hydrogène [réaction (4)]. Cette réaction est thermodynamiquement favorable en raison de l'inégalité suivante qui est vérifiée : $E^{\circ'} \text{ } ^\circ\text{OH}/\text{H}_2\text{O} > E^{\circ'} \text{ } \text{H}_2\text{O}_2/^\circ\text{OH}$ (2,34 V. > 0,30 V.) (tableau I). De même, le radical superoxyde réagit sur lui-même pour donner du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène [réaction (5)], car l'inégalité entre les potentiels standard est favorable (0,93 V. > -0,33 V.) (tableau I). Dans ce dernier cas, la réaction s'appelle une réaction de dismutation, car le radical superoxyde donne naissance conjointement à une espèce plus oxydée (O_2) et à une espèce plus réduite (H_2O_2) que lui-même.



Dans le cas des couples échangeant deux électrons ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$), il est également aisé de démontrer que la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène [réaction (6)] est ther-

modynamiquement favorable (1,34 V. > 0,30 V.) (tableau I).



Enfin, remarquons qu'entre O_2 et H_2O , il y a un échange de quatre électrons (tableau I), ce qui correspond à l'échange effectué lors des réactions de combustion.

En résumé, les potentiels standards d'oxydo-réduction des couples concernant les intermédiaires réduits de l'oxygène permettent de prévoir les réactions thermodynamiquement possibles entre ERO, mais également les réactions des ERO avec les substrats biologiques (bases de l'ADN, nucléotides, acides aminés, peptides, protéines, phospholipides...). Formellement, cela nécessite la connaissance des potentiels standards des couples biologiques correspondants et, en particulier des couples échangeant un seul électron [6, 7]. Cependant, ces potentiels standards sont loin d'être tous connus et, pratiquement, l'étude expérimentale des processus radicalaires pallie souvent l'absence de données.

Propriétés cinétiques

La vitesse d'une réaction chimique (thermodynamiquement spontanée) est un paramètre crucial de la réactivité entre deux molécules (radicalaires ou non). Rappelons brièvement que la vitesse d'une réaction chimique entre deux réactifs est proportionnelle à la concentration de ces réactifs ; le coefficient de proportionnalité symbolisé par k étant appelé la constante de vitesse³. Celle-ci est toujours inférieure ou au plus égale à une valeur limite supérieure ($10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) imposée par la diffusion des molécules. Par exemple, les réactions chimiques entre espèces non radicalaires ont généralement des constantes de vitesse plutôt faibles (comprises entre 10^{-2} et $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui traduit le fait que ces réactions ne peuvent avoir lieu sans un apport énergétique supplémentaire (énergie d'activation) limitant ainsi la vitesse de la réaction. Au contraire, dans le cas des réactions chimiques mettant en jeu des espèces radicalaires, les constantes de vitesse sont géné-

Tableau I. — Propriétés oxydo-réductrices des espèces réactives de l'oxygène. Chaque couple oxydo-réducteur est caractérisé par le nombre d'électron(s) échangé(s) entre l'oxydant et le réducteur, ainsi que par son potentiel standard à pH = 7. Les valeurs de $E^{\circ'}$ sont déterminées par rapport à celle de l'électrode à hydrogène prise comme référence ($E^{\circ\text{H}^+}/\text{H}_2 = 0$). *Redox properties of the reactive oxygen species. Each redox couple is characterized by the number of exchanged electron(s) between oxidant and reducing species, and by its standard reduction potential at pH = 7. The values of $E^{\circ'}$ are determined versus the potential of hydrogen electrode as chemical reference ($E^{\circ\text{H}^+}/\text{H}_2 = 0$).*

Couple Ox/Red	Nombre d'électron(s)	$E^{\circ'}$ (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

³ Réaction élémentaire du 2^e ordre, $v = k \times [\text{réactif A}] \times [\text{réactif B}]$, avec [réactif A (ou B)] exprimé en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et k en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$.

ralement très élevées et par conséquent très proches de la valeur limite ($10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui signifie que la réaction se produit à chaque rencontre entre un radical et sa cible moléculaire (sans apport énergétique particulier). Prenons le cas du radical hydroxyle $^{\circ}\text{OH}$ qui illustre parfaitement notre propos. Ses constantes de vitesse avec de nombreux substrats biologiques (bases de l'ADN, nucléotides, acides aminés, peptides, acides gras polyinsaturés, phospholipides...) sont de l'ordre de 10^8 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [8]. Par conséquent, la durée de vie d'un radical hydroxyle en milieu biologique est extrêmement faible, elle ne dépasse pas quelques microsecondes (10^{-6} s). Le radical $^{\circ}\text{OH}$ est donc une espèce qui ne diffuse quasiment pas au sein des milieux biologiques et qui réagit sur le lieu même de sa production, ce qui lui confère une toxicité extrême.

Le radical superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ a une réactivité beaucoup plus nuancée dans la mesure où, mis à part quelques cibles spécifiques (en particulier les enzymes superoxyde dismutases, SODs, dont il est le substrat ($k(\text{O}_2^{\circ-} + \text{SOD}) = 2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)), il réagit très lentement avec les molécules biologiques. Ses constantes de vitesse sont généralement inférieures à $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, vis-à-vis de nombreux substrats bio-organiques (ADN et ses constituants, protéines et leurs constituants, lipides membranaires...) [9]. Cependant, le radical superoxyde se dismute relativement rapidement à $\text{pH} = 7$ (constante de vitesse : $6 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [9]), en l'absence d'enzyme, si bien qu'il disparaît plus vite en réagissant sur lui-même qu'en attaquant les systèmes moléculaires. Par conséquent, le radical superoxyde ne présente pas de toxicité « directe » vis-à-vis des matériaux biologiques. Toutefois, la présence *in vivo* d'enzymes telles que les SODs, qui accélèrent sa dismutation [réaction (5)], semble impliquer un effet relativement délétère des radicaux $\text{O}_2^{\circ-}$. Les différentes hypothèses rendant compte de cette toxicité « différée » sont proposées dans le prochain paragraphe.

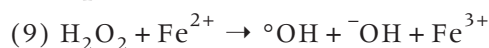
D'autres radicaux libres, comme les radicaux peroxydes RO_2° appartenant eux aussi à la famille des ERO, possèdent des propriétés cinétiques intéressantes. Ces dernières sont évoquées à l'occasion de la description du mode d'action des radicaux hydroxyles (également dans le prochain paragraphe).

Modes d'action des radicaux superoxydes et hydroxyles

Comme nous venons de le voir, les radicaux $\text{O}_2^{\circ-}$ ne réagissent pas directement avec les substrats bio-organiques. Les hypothèses permettant de mieux comprendre sa toxicité « différée » mettent toutes l'accent sur la possibilité pour les radicaux superoxydes d'être à l'origine de la formation d'autres espèces radicalaires (ou moléculaires), beaucoup plus réactives qu'eux-mêmes. C'est ainsi que, selon Haber et Weiss [10], le radical superoxyde réagirait avec le peroxyde d'hydrogène [réaction (7)] en donnant naissance à des radicaux hydroxyles dont on connaît l'extrême toxicité. Cependant, cette réaction qui, en réalité est très lente, nécessite la présence d'un catalyseur (Fe^{3+}) pour être efficace. Une deuxième hypothèse concerne la formation d'anion peroxydinitrite ONOO^- via la réaction bi-radicalaire entre le radical superoxyde et le monoxyde d'azote $^{\circ}\text{NO}$ [réaction (8)]. Le peroxydinitrite est connu pour endommager de nombreuses cibles biologiques (ADN, protéines, lipides...) [11]. Une troisième hypothèse est relative à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par réaction de dismutation des radicaux superoxydes [réaction (5)], le peroxyde d'hydrogène étant à l'origine de l'apparition de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton [réaction (9)] en présence de traces de cations métalliques [12]. Remarquons enfin, que la forme protonée HO_2° (forme acide conjuguée de $\text{O}_2^{\circ-}$, $\text{pK}_a(\text{HO}_2^{\circ}/\text{O}_2^{\circ-}) = 4,8$) est sensiblement plus réactive que la forme basique $\text{O}_2^{\circ-}$ [9]. Cette observation constitue une quatrième hypothèse de toxicité « différée » des radicaux superoxydes via une diminution de pH . Il est possible que chacune de ces hypothèses participent ensemble, ou séparément, selon les circonstances, aux effets délétères des radicaux superoxydes.



(réaction de Haber Weiss)

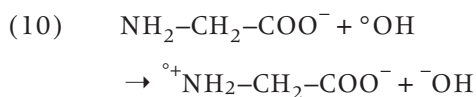


(réaction de Fenton)

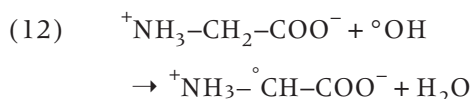
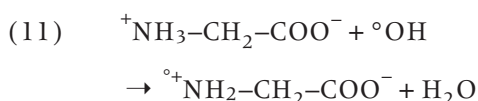
Dans le cas des radicaux hydroxyles, l'attaque des molécules biologiques est directe et elle se traduit

par leur oxydation mono-électronique (enlèvement d'un seul électron à la fois), générant ainsi d'autres radicaux libres localisés sur les cibles elles-mêmes. Les sites radicalaires, ainsi créés, peuvent apparaître sur des atomes de carbone, d'azote, de soufre ou d'oxygène. Les oxydations initiées par les radicaux °OH peuvent s'effectuer selon trois voies possibles :

— La première est un transfert de charge illustré ici par la réaction du radical °OH sur la glycine (acide aminé constitutif des protéines) [réaction (10)]. Cette réaction permet au radical hydroxyle de s'emparer d'un électron apparié (ici un électron du doublet de l'atome d'azote) et de générer un site radicalaire sur la fonction amine de la glycine (sous sa forme déprotonée).



— La deuxième voie est relative à l'arrachement d'un atome d'hydrogène, H, sur les molécules organiques. À titre d'exemples, les réactions (11) et (12) illustrent ce phénomène sur la molécule de glycine (sous sa forme amphotère). Deux sites radicalaires différents peuvent ainsi être formés, l'un sur l'atome d'azote [réaction (11)], l'autre sur l'un des atomes de carbone [réaction (12)].



— La troisième voie s'exprime au niveau des systèmes moléculaires comportant des doubles liaisons, comme par exemple, les bases de l'ADN (guanine, adénine, cytosine, thymine), les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, histidine), ou encore les acides gras polyinsaturés. En effet, les radicaux hydroxyles, toujours avides d'électrons, s'additionnent sur les doubles liaisons en donnant naissance à des sites radicalaires sur des atomes de carbone. La réaction (13) symbolise ce dernier mode d'action.



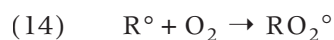
Les sites radicalaires générés à la suite de l'action des radicaux °OH sur les différentes cibles biologiques ont une réactivité chimique propre qui a pu être mise en évidence grâce à de nombreuses études *in vitro* effectuées sur des modèles plus simples que la réalité biologique. Ainsi, la caractérisation de l'action des radicaux hydroxyles sur l'ADN a nécessité l'étude de chaque base de l'ADN prise séparément, puis l'étude de certains nucléotides, celle des polynucléotides et enfin celle de l'ADN [13, 14]. Les résultats de ces recherches, depuis une quinzaine d'années, ont permis d'identifier les divers dommages chimiques « stables » (c'est-à-dire non radicalaires) formés à la suite de l'action des radicaux hydroxyles sur l'ADN. Parmi les lésions chimiques qui ont pu être caractérisées, outre celles des quatre bases oxydées, citons (i) les ruptures de brins (simples ou doubles) résultant non pas de l'attaque des radicaux °OH sur les bases, mais de leur réaction sur les groupes sucre-phosphates, (ii) les sites abasiques issus également de l'attaque des radicaux °OH sur les groupes sucre-phosphates, ainsi que (iii) les pontages ADN-protéines provenant de réactions bi-radicalaires « mixtes » entre l'ADN et les protéines qui l'entourent.

Dans le cas des dommages oxydatifs infligés aux protéines par les radicaux hydroxyles, la même démarche expérimentale que celle précédemment évoquée dans le cas de l'ADN, a été appliquée, c'est-à-dire des modèles les plus simples (acides aminés pris séparément) aux plus compliqués (protéines et complexes protéiques). Les résultats font apparaître diverses lésions chimiques « stables » [15], parmi lesquelles les fonctions carbonyles (-C=O) occupent une place importante. La carbonylation des protéines résulte de l'oxydation (par enlèvement d'atomes H) des chaînes saturées d'acides aminés aliphatiques comme par exemple la glycine ou l'alanine [16]. Dans le cas des acides aminés comportant un atome de soufre (méthionine, cystéine), celui-ci peut-être la cible des radicaux °OH conduisant alors à des fonctions sulfoxydes (-SO), à des ponts disulfures (-S-S-) ou à des fonctions sulféniques (-S-OH). Quant aux acides aminés aromatiques, par addition des radicaux hydroxyles sur les doubles liaisons, ils donnent lieu à des oxydations spécifiques comme par exemple la formation de bityrosine dans le cas de

la tyrosine et celle de N-formylkynurénine dans le cas du tryptophane. À côté de ces lésions oxydatives, des phénomènes de fragmentation des chaînes polypeptidiques sont également observés. Soulignons le fait que la fragmentation se produit non pas au niveau des liaisons peptidiques (-CO-NH) qui relient les acides aminés entre eux, mais au niveau des chaînes aliphatiques carbonylées.

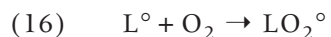
Cependant, tous les acides aminés d'une même protéine ne sont pas « égaux » face à l'attaque des radicaux hydroxyles, en raison de la structure tridimensionnelle de chaque protéine qui permet de distinguer les acides aminés de « surface », accessibles au solvant, des acides aminés « masqués », situés dans les zones hydrophobes de la protéine. C'est ainsi que certains sites actifs enzymatiques localisés au plus « profond » des chaînes polypeptidiques sont peu sensibles à l'action des radicaux hydroxyles, le pourcentage d'inactivation ne dépassant pas 10 % de l'ensemble des radicaux hydroxyles initiateurs du phénomène [17]. Cela signifie que la majeure partie des radicaux °OH (90 %) disparaissent, par réaction avec les acides aminés qui leur sont accessibles, avant de pouvoir atteindre le site enzymatique.

Si les dommages oxydatifs générés par action des radicaux hydroxyles sur l'ADN, ou les protéines, sont de mieux en mieux caractérisés, leurs mécanismes de formation ne sont pas toujours parfaitement élucidés. Cependant, le trait commun de ces mécanismes est l'intervention d'intermédiaires radicalaires tels que les radicaux peroxytes, RO_2° qui appartiennent eux aussi à la famille des ERO. En effet, les peroxy-radicaux apparaissent comme des radicaux « secondaires » issus de l'addition de dioxygène sur les sites radicalaires carbonés R° [réaction (14)], provenant eux-mêmes de l'attaque des radicaux °OH sur les molécules organiques. Les constantes de vitesse de ce type de réactions sont de l'ordre de 10^8 à 10^9 mol⁻¹.L.s⁻¹, quelle que soit la nature du radical R° , si bien que la vitesse des réactions correspondantes est très élevée. En présence de dioxygène (milieu aéré), il y a transformation totale des radicaux centrés sur le carbone, en radicaux centrés sur l'oxygène.



Les radicaux peroxytes RO_2° sont des espèces oxydantes. Leurs propriétés cinétiques sont inter-

médiaires entre celles des radicaux hydroxyles et celles des radicaux superoxydes. En effet, leurs constantes de vitesse sont généralement comprises entre 10^2 et 10^8 mol⁻¹.L.s⁻¹, ce qui leur confère une certaine toxicité directe. Parmi leurs modes d'action qui sont très divers [18], soulignons celui de l'arrachement d'atome H qui joue un rôle particulièrement important dans la peroxydation des lipides membranaires. Ces derniers, en raison du rapprochement des longues chaînes carbonées qui les constituent, sont regroupés en structures compactes qui autorisent la propagation des dommages radicalaires. Ainsi, un radical peroxyte lipidique, symbolisé ici par LO_2° , peut aisément arracher un atome d'hydrogène d'une chaîne carbonée voisine (LH), initiant la formation d'un nouveau radical centré sur le carbone, L° [réaction (15)]. Ce dernier réagit alors avec l'oxygène pour donner naissance à un autre radical peroxyte [réaction (16)]. Les réactions consécutives (15) et (16) peuvent se répéter, provoquant la propagation en chaîne des lésions oxydatives au sein des systèmes membranaires.



Une telle propagation des sites radicalaires amplifie notablement le phénomène d'oxydation initié par les radicaux hydroxyles.

Conclusion

La connaissance des propriétés physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène et, en particulier des espèces radicalaires (°OH, $O_2^{\circ-}$, RO_2°), permet de mieux comprendre les effets potentiels de ces espèces en biologie. Les données thermodynamiques et cinétiques caractérisant les ERO ont été le plus souvent acquises à partir de systèmes moléculaires simples (par exemple, une base de l'ADN, seule en solution aqueuse) soumis à un flux de radicaux libres d'origine chimique, enzymatique ou physico-chimique (action des rayonnements ionisants). Parmi les méthodes de production des ERO *in vitro*, celle de la radiolyse de l'eau [19, 20] est sans doute celle qui a apporté et qui continue à apporter le plus de résultats concernant les proprié-

tés physico-chimiques des ERO. En effet, cette méthode présente plusieurs intérêts. Le premier concerne la possibilité de produire sélectivement les espèces radicalaires que l'on souhaite étudier (les radicaux °OH seuls, les radicaux O₂^{o-} seuls...), le second est relatif à la maîtrise de la vitesse de production de ces espèces autorisant ainsi le traitement quantitatif des données, et le troisième est la propriété de la méthode puisque la création *in situ* (dans l'eau) d'espèces radicalaires évite toute pollution due à des réactifs (chimiques ou enzymatiques) nécessaires à la génération de ces radicaux.

Par ailleurs, la connaissance des propriétés physico-chimiques des ERO permet de caractériser la réactivité des antioxydants, qui sont des composés susceptibles de s'opposer et d'inhiber plus ou moins efficacement les phénomènes de stress oxydant. En effet, les réactions d'oxydation mono-électroniques (transfert d'un seul électron), initiées par les radicaux (°OH et/ou O₂^{o-}) sur les antioxydants, relèvent de la même problématique que celle décrite dans le cas de l'oxydation radicalaire des biomolécules. À ce titre, les antioxydants apparaissent comme des réducteurs chimiques (alcools, thiols, phénols, polyphénols, caroténoïdes...) pouvant limiter l'action des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène en réagissant avec elles et par conséquent en les détournant des cibles biologiques. De plus, ces réducteurs peuvent entrer en compétition avec l'oxygène et jouer le rôle de « réparateur » de certaines lésions radicalaires [19].

En conclusion, il est clair que l'approche physico-chimique des processus bioradicalaires rapides concourt, par sa rigueur, à caractériser à l'aide de données fondamentales l'ensemble des réactions et des mécanismes réactionnels mis en jeu lors des phénomènes de stress oxydant au niveau moléculaire.

Références

1. Hensley K, Floyd RA. Reactive Oxygen Species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 377-83.
2. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition; Oxford University Press; 1999, 936 pages.
3. Cadenas E, Davies JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Bio Med* 2000; 29: 222-30.
4. Beaudeau JL, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, The-ron P, Delattre J, Legrand A. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann Pharm Fr* 2006 ; 64 : 373-81.
5. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux Libres et Stress Oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier Tec et Doc ; 2005, 549 pages.
6. Wardman P. Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution. *J Phys Chem Ref Data* 1989; 184: 1637-755.
7. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-43.
8. Buxton GV. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (OH/O⁻) in aqueous solution. *J Phys Chem Ref Data* 1988; 17: 513-886.
9. Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of HO₂^o/O₂^{o-} radicals in aqueous solutions. *J Phys Chem Ref Data* 1985; 14: 1041-99.
10. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* 1934; A147: 332-51.
11. Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH. Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 1285-92.
12. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 1996; 145: 523-31.
13. Cadet J, Berger M, Buchko GW, Joshi PC, Raoul S, Ravanat JL. 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-b-D-erythro-pentofuranosyl) amino]-5-(2H) oxazolone: a novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-di-O-acetyl-2'-deoxyguanosine. *J Am Chem Soc* 1994; 116: 7403-4.
14. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL *et al.* Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research* 1999; 424: 9-21.
15. Bonnefont-Rousselot D, Beaudeau JL, Delattre J. Oxydation des acides aminés et des protéines *in* Radicaux Libres et Stress Oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier Tec et Doc ; 2005 : 147-67.
16. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal-

- catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 797-821.
17. Fortun A, Gardès-Albert M. Effect of $^{\circ}\text{OH}/\text{O}_2^{\circ-}$ free radicals on the enzymatic activity of beef liver catalase. *J Chim Phys* 1994; 91: 1070-7.
18. von Sonntag C, Schuchmann HP. Peroxyl radicals in aqueous solutions in Peroxyl Radicals. *Alfassi ZB* 1997: 174-234.
19. Gardès-Albert M, Jore D. Aspects physico-chimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène in Radicaux Libres et Stress Oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier Tec et Doc ; 2005 : 1-23.
20. Bonnefont-Rousselot D. Gamma radiolysis as a tool to study lipoprotein oxidation mechanisms. *Biochimie* 2004; 86: 903-11.