

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

La nature chimique et la réactivité de l'oxygène

SERTEYN D.^{1,2}, MOUTHYS-MICKALAD A.¹, FRANCK T.^{1,2}, GRULKE S.^{1,2}, LAMY M.^{1,3}, DEBY C.¹, DEBY-DUPONT G.^{1,3}

1 Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, Université de Liège, Institut de Chimie, B6a, Sart Tilman, 4000 Liège

2 Anesthésiologie générale et Pathologie chirurgicale des grands Animaux, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, B-41, Boulevard de Colonster, 20, Sart Tilman, 4000 Liège

3 Service d'Anesthésie-Réanimation, Faculté de Médecine, CHU, B 35, Université de Liège, Sart Tilman, 4000 Liège

Correspondance : Professeur Didier Serteyn

e-mail: didier.serteyn@ulg.ac.be

RESUME : Vu l'enthousiasme que portent de nombreux pathologistes et cliniciens à la production des formes activées de l'oxygène lors de diverses maladies, le présent travail rappelle, sous forme de synthèse, la nature chimique et la réactivité de l'oxygène. Il explique la formation des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote, leurs mécanismes de production *in vivo* et leurs effets physiologiques et toxiques, en soulignant un aspect récent : leur rôle dans la signalisation cellulaire et l'apoptose.

Travail réalisé dans le cadre d'un projet " Initiative 3 " de la Région Wallonne (Convention 011/4695).

INTRODUCTION

La réactivité de l'oxygène et ses possibilités de produire des dérivés oxydants ont été méconnues jusqu'aux années 60 ; l'oxygène était reconnu comme un élément nécessaire à la vie aérobie, mais considéré comme un simple " substrat " destiné à recevoir 4 électrons en provenance de la chaîne respiratoire mitochondriale et à être réduit en eau. La question de sa réactivité avec la matière vivante, et de sa toxicité suscitait peu d'intérêt. Les radiobiologistes furent les premiers à l'envisager sous un aspect " toxique " en le faisant " intervenir " dans le traitement des tumeurs. Depuis quelques dizaines d'années, la façon de considérer l'oxygène s'est transformée et on admet qu'il existe un métabolisme de l'oxygène gouverné par des enzymes spécialisées, avec des possibilités d'erreurs de métabolisation conduisant à la formation excessive d'espèces dérivées dangereuses, les ROS (*reactive oxygen species*), désignées aussi sous d'autres sigles comme ROI (*reactive oxygen intermediates*).

Les études sur les ROS se sont multipliées après les travaux de Fridovich sur l'anion superoxyde (McCord et Fridovich, 1968; Fridovich, 1978) et se sont compliquées par l'arrivée de la famille des *reactive nitrogen species* (RNS, parfois aussi désignées sous le sigle RNI, *reactive nitrogen intermediates*) avec pour premier maillon le radical monoxyde d'azote (*NO). En réalité, les RNS sont un sous-groupe des ROS, puisque le *NO contient déjà l'atome d'oxygène, que la formation des dérivés du *NO dépend de la présence de l'oxygène et que les RNS contiennent toutes un ou plusieurs atomes d'oxygène. Dans ce texte, nous utiliserons RNOS (*reactive nitrogen oxygen species*) pour désigner l'ensemble des " espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote ". Depuis quelques années, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, les RNOS sont considérées comme intervenant dans la physiopathologie de nombreuses pathologies tant inflammatoires et aiguës que dégénératives et chroniques (Serteyn *et al.*, 1990 ; Goode et Webster, 1993 ; van der Vliet *et al.*,

1999 ; Hensley *et al.*, 2000 ; van der Vliet et Cross, 2000 ; Lamy *et al.*, 2001). L'analyse des données de la littérature dans ce domaine fait apparaître de nombreuses imprécisions et, souvent, les notions chimiques de base sont négligées ou carrément erronées. En outre, les opinions courantes sur le danger des espèces radicalaires sont généralement exagérées. Rappelons ici l'avis de Stubbe (1990) qui considère comme faux le raisonnement qui présente tout radical libre comme une espèce toujours hautement réactionnelle et incontrôlable, uniquement responsable de destruction, sans rôle métabolique. L'objectif de ce travail est de rappeler, sous forme de synthèse, les éléments de base de la biochimie de l'oxygène, la formation des RNOS, en insistant sur l'équilibre oxydo-réducteur de la cellule, et leur rôle dans la transduction du signal intracellulaire et l'apoptose.

LA NATURE CHIMIQUE ET LA RÉACTIVITÉ DE L'OXYGÈNE

L'oxygène réagit avec la matière vivante soit en acceptant des électrons soit en se fixant sur la matière organique : dans le premier cas, on parle d'oxydations, dans le second cas d'oxygénation. La captation par l'oxygène de deux atomes d'hydrogène avec leur électron pour former une molécule d'eau (H_2O) constitue le cas d'oxydation le plus connu et la "fixation" de O_2 sur un carbone pour former CO_2 est un exemple d'oxygénation. Mais pour réaliser oxydations et oxygénations, l'oxygène doit franchir une barrière énergétique importante, puisqu'il est normalement inerte face à la matière vivante, absence de réaction qui explique sa teneur élevée (21 %) dans l'atmosphère. Sans cette barrière énergétique conduisant à l'interdiction réactionnelle, l'oxygène aurait disparu de l'atmosphère terrestre (comme c'est le cas pour le chlore).

La chimie moderne explique cette inertie de l'oxygène par sa structure totalement inhabituelle. Contrairement à la plupart des molécules dans lesquelles les électrons sont groupés par paires (ils sont appariés), l'oxygène fondamental diatomique (O_2) est biradicalaire, puisque deux de ses électrons ne sont pas appariés (ils sont célibataires et non libres comme on l'écrit souvent abusivement). O_2 est dit "à l'état triplet", tandis que les molécules avec tous leurs électrons appariés sont dites "à l'état singulet" et que les molécules à un seul électron célibataire sont dites "à l'état doublet".

Les notions d'état singulet, doublet et triplet

Pour comprendre ces expressions d'état triplet, doublet et singulet, il faut retourner à l'origine de leur découverte et rappeler certaines étapes du développement de la chimie quantique. Faisant suite aux observations de luminescence faites par Crookes, de nombreuses études expérimentales sur les phénomènes d'émission lumineuse par les gaz soumis à une tension électrique furent entreprises après la première guerre mondiale, et Lynen parvint à établir une règle empirique pour ordonner certaines des séries de raies observées lorsqu'on excite l'hydrogène.

Zeeman eut l'idée de placer le tube où se produisaient les phénomènes lumineux dans un champ magnétique et observa que, là où pour certains gaz le spectrographe ne montrait qu'une seule raie, la présence du champ magnétique pouvait transformer cette raie. Tantôt la raie disparaissait et faisait place à deux raies identiques disposées symétriquement autour de l'endroit précédemment occupé (le méthane par exemple). Tantôt la raie subsistait, mais s'entourait de deux raies satellites (ce qui se passe pour l'oxygène). Il y avait aussi des gaz, comme le néon, dont les raies restaient inchangées malgré le champ magnétique. C'est de là que sont nés les termes singulet (une raie), doublet (deux raies) et triplet (trois raies).

Les travaux scientifiques en mécanique quantique permirent ensuite de mettre de l'ordre dans toutes les observations réalisées par les "empiristes" et d'énoncer certaines règles que les spécialistes peuvent démontrer par le calcul. Celles qui nous intéressent ici ont été énoncées par Pauli :

- dans une portion de l'espace-temps, appelée orbitale, peuvent exister 0, 1 ou 2 électrons ;
- la règle de Hund nous apprend que, pour un nombre d'électrons donnés appartenant à un atome, le maximum d'orbitales sera occupé ;
- troisièmement, lorsque deux électrons coexistent dans une même orbitale, ils orientent leur vecteur spin de manière opposée (en antiparallèle).

Pour vulgariser la notion de spin, on a souvent comparé l'électron à une toupie (le mot anglais *spin* signifie d'ailleurs toupie). La rotation de l'électron, masse électrique, engendre un vecteur magnétique, le spin, perpendiculaire au plan de rotation, orienté vers le haut ou vers le bas. La valeur du spin est définie comme égale à $1/2$ (figure 1 A).

Dans les expériences de Zeeman, le champ magnétique, en interagissant avec les spins électroniques, produisait des effets de dédoublement des raies d'émission de certains éléments ou composés. On comprit ensuite que les gaz dont le spectre restait inchangé étaient formés d'atomes dont tous les électrons étaient appariés deux par deux, avec leur spin en position antiparallèle (orienté dans la direction opposée) donnant une résul-

tante magnétique nulle. Dans le cas des gaz où une raie se dédoubleait, on put démontrer que ce dédoublement était associé à la présence d'un (et un seul) électron non apparié (appelé aussi électron célibataire). Dans le cas de l'oxygène où apparaissaient trois raies, on démontra la présence de deux électrons célibataires. On en arriva alors à énoncer une équation simple, la règle de multiplicité (M) : $M = 2S + 1$ où S est la somme de tous les spins des électrons présents dans un atome ou une molécule. Il est évident que là où tous les électrons sont appariés $S = 0$: cet état est appelé singulet et concerne la plus grande partie des molécules de notre biosphère. Dans le cas des atomes présentant un électron célibataire, S sera égal à $1/2$ et $M = 2$; ce sont des radicaux libres, ne comportant qu'un seul électron non apparié, et cet état est appelé l'état doublet. Les anglosaxons, qui ont tendance à abréger, parlent des radicaux libres comme

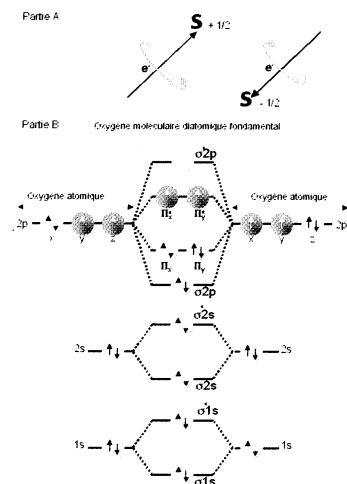


Figure 1 :

IA : Notion de spin électronique

La rotation de l'électron crée un moment magnétique, le spin s (représenté par la flèche sur la figure), perpendiculaire au plan de rotation, et auquel sont attribuées les valeurs $+ 1/2$ ou $- 1/2$ selon l'orientation. Un changement de l'orientation du spin nécessite une fourniture d'énergie et n'est donc pas spontané (règle de restriction du spin).

IB : Structure électronique de la molécule d'oxygène diatomique fondamental (O_2), obtenue à partir de la combinaison des deux atomes d'oxygène.

L'atome d'oxygène possède 8 électrons répartis sur l'orbitale $1s$ (couche $n = 1$) et sur les 4 orbitales des sous-couches $2s$ et $2p$ (couche externe, $n = 2$); chaque orbitale peut contenir au maximum deux électrons (avec leur spin en position antiparallèle). En fonction de la règle de Hund, le maximum d'orbitales de même énergie sera occupé et l'atome d'oxygène a deux électrons non appariés.

Les orbitales (liantes s et p ; antiliantes s^* et p^*) de la molécule d'oxygène sont obtenues par combinaison des orbitales des atomes d'oxygène et sont occupées dans le respect de la règle de Hund, laissant deux électrons non appariés et faisant d' O_2 une molécule à l'état triplet.

LA NATURE CHIMIQUE ET LA RÉACTIVITÉ DE L'OXYGÈNE

L'oxygène réagit avec la matière vivante soit en acceptant des électrons soit en se fixant sur la matière organique: dans le premier cas, on parle d'oxydations, dans le second cas d'oxygénation. La captation par l'oxygène de deux atomes d'hydrogène avec leur électron pour former une molécule d'eau (H_2O) constitue le cas d'oxydation le plus connu et la "fixation" de O_2 sur un carbone pour former CO_2 est un exemple d'oxygénation. Mais pour réaliser oxydations et oxygénations, l'oxygène doit franchir une barrière énergétique importante, puisqu'il est normalement inerte face à la matière vivante, absence de réaction qui explique sa teneur élevée (21 %) dans l'atmosphère. Sans cette barrière énergétique conduisant à l'interdiction réactionnelle, l'oxygène aurait disparu de l'atmosphère terrestre (comme c'est le cas pour le chlore).

La chimie moderne explique cette inertie de l'oxygène par sa structure totalement inhabituelle. Contrairement à la plupart des molécules dans lesquelles les électrons sont groupés par paires (ils sont appariés), l'oxygène fondamental diatomique (O_2) est biradicalaire, puisque deux de ses électrons ne sont pas appariés (ils sont célibataires et non libres comme on l'écrit souvent abusivement). O_2 est dit "à l'état triplet", tandis que les molécules avec tous leurs électrons appariés sont dites "à l'état singulet" et que les molécules à un seul électron célibataire sont dites "à l'état doublet".

Les notions d'état singulet, doublet et triplet

Pour comprendre ces expressions d'état triplet, doublet et singulet, il faut retourner à l'origine de leur découverte et rappeler certaines étapes du développement de la chimie quantique. Faisant suite aux observations de luminescence faites par Crookes, de nombreuses études expérimentales sur les phénomènes d'émission lumineuse par les gaz soumis à une tension électrique furent entreprises après la première guerre mondiale, et Lynen parvint à établir une règle empirique pour ordonner certaines des séries de raies observées lorsqu'on excite l'hydrogène.

Zeeman eut l'idée de placer le tube où se produisaient les phénomènes lumineux dans un champ magnétique et observa que, là où pour certains gaz le spectrographe ne montrait qu'une seule raie, la présence du champ magnétique pouvait transformer cette raie. Tantôt la raie disparaissait et faisait place à deux raies identiques disposées symétriquement autour de l'endroit précédemment occupé (le méthane par exemple). Tantôt la raie subsistait, mais s'entourait de deux raies satellites (ce qui se passe pour l'oxygène). Il y avait aussi des gaz, comme le néon, dont les raies restaient inchangées malgré le champ magnétique. C'est de là que sont nés les termes singulet (une raie), doublet (deux raies) et triplet (trois raies).

Les travaux scientifiques en mécanique quantique permirent ensuite de mettre de l'ordre dans toutes les observations réalisées par les "empiristes" et d'énoncer certaines règles que les spécialistes peuvent démontrer par le calcul. Celles qui nous intéressent ici ont été énoncées par Pauli :

- dans une portion de l'espace-temps, appelée orbitale, peuvent exister 0, 1 ou 2 électrons ;
- la règle de Hund nous apprend que, pour un nombre d'électrons donnés appartenant à un atome, le maximum d'orbitales sera occupé ;
- troisièmement, lorsque deux électrons coexistent dans une même orbitale, ils orientent leur vecteur spin de manière opposée (en antiparallèle).

Pour vulgariser la notion de spin, on a souvent comparé l'électron à une toupie (le mot anglais *spin* signifie d'ailleurs toupie). La rotation de l'électron, masse électrique, engendre un vecteur magnétique, le spin, perpendiculaire au plan de rotation, orienté vers le haut ou vers le bas. La valeur du spin est définie comme égale à $1/2$ (figure 1 A).

Dans les expériences de Zeeman, le champ magnétique, en interagissant avec les spins électroniques, produisait des effets de dédoublement des raies d'émission de certains éléments ou composés. On comprit ensuite que les gaz dont le spectre restait inchangé étaient formés d'atomes dont tous les électrons étaient appariés deux par deux, avec leur spin en position antiparallèle (orienté dans la direction opposée) donnant une résul-

tante magnétique nulle. Dans le cas des gaz où une raie se dédoubleait, on put démontrer que ce dédoublement était associé à la présence d'un (et un seul) électron non apparié (appelé aussi électron célibataire). Dans le cas de l'oxygène où apparaissaient trois raies, on démontra la présence de deux électrons célibataires. On en arriva alors à énoncer une équation simple, la règle de multiplicité (M) : $M = 2S + 1$ où S est la somme de tous les spins des électrons présents dans un atome ou une molécule. Il est évident que là où tous les électrons sont appariés $S = 0$: cet état est appelé singulet et concerne la plus grande partie des molécules de notre biosphère. Dans le cas des atomes présentant un électron célibataire, S sera égal à $1/2$ et $M = 2$; ce sont des radicaux libres, ne comportant qu'un seul électron non apparié, et cet état est appelé l'état doublet. Les anglosaxons, qui ont tendance à abréger, parlent des radicaux libres comme

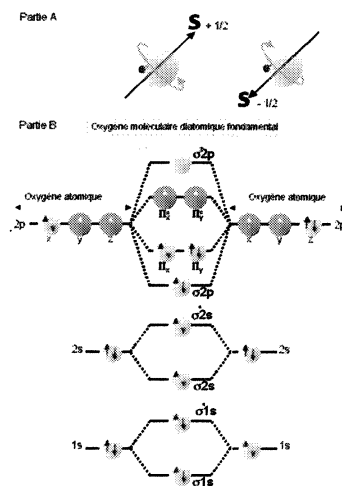


Figure 1 :

1A : Notion de spin électronique

La rotation de l'électron crée un moment magnétique, le spin s (représenté par la flèche sur la figure), perpendiculaire au plan de rotation, et auquel sont attribuées les valeurs $+ 1/2$ ou $- 1/2$ selon l'orientation. Un changement de l'orientation du spin nécessite une fourniture d'énergie et n'est donc pas spontané (règle de restriction du spin).

1B : Structure électronique de la molécule d'oxygène diatomique fondamentale (O_2), obtenue à partir de la combinaison des deux atomes d'oxygène.

L'atome d'oxygène possède 8 électrons répartis sur l'orbitale $1s$ (couche $n = 1$) et sur les 4 orbitales des sous-couches $2s$ et $2p$ (couche externe, $n = 2$) ; chaque orbitale peut contenir au maximum deux électrons (avec leur spin en position antiparallèle). En fonction de la règle de Hund, le maximum d'orbitales de même énergie sera occupé et l'atome d'oxygène a deux électrons non appariés.

Les orbitales (liantes s et p ; antiliantes s^* et p^*) de la molécule d'oxygène sont obtenues par combinaison des orbitales des atomes d'oxygène et sont occupées dans le respect de la règle de Hund, laissant deux électrons non appariés et faisant d' O_2 une molécule à l'état triplet.

des doublets (à ne pas confondre avec les doublets électroniques mis en jeu dans la liaison chimique). Pour les corps qui présentent trois raies, on met en évidence par calcul qu'il y a deux électrons célibataires sur l'édifice et qu'ils possèdent une $M = 3$ [$2(1/2 + 1/2) + 1 = 3$]. Les dénominations singulet, doublet et triplet, basées sur la spectrographie, répondent donc à une valeur de M égale respectivement à 1, 2 et 3.

L'oxygène diatomique fondamental (O_2) est à l'état triplet ($M = 3$) et possède donc deux électrons non appariés (Hamilton, 1974). La figure 1B détaille la structure électronique d' O_2 . Mais l'oxygène fondamental à l'état triplet peut devenir singulet si l'on force les deux électrons à s'apparier en fournissant beaucoup d'énergie : on obtient alors l'oxygène singulet qui ne possède plus d'électron célibataire, mais qui sera instable par suite de son état énergétique élevé.

Les règles quantiques régulant les réactions entre molécules

La mécanique quantique était aussi arrivée à certaines conclusions supplémentaires concernant les possibilités réactionnelles entre molécules selon leur état singulet, doublet ou triplet, conclusions qui laissèrent les chimistes et les biochimistes indifférents pendant de nombreuses années. Ainsi on passa sous silence une propriété assez extraordinaire d' O_2 , son inertie chimique, pourtant soulignée dès avant les années 50, notamment par Waters (1945) qui écrivait "*oxygen is too inert to combine immediately with the double bond of an olefin or an aldehyde and a catalyst is usually required to start a reaction chain...*". Ce sont probablement les premiers voyages interplanétaires qui, en montrant que les auteurs de science fiction s'étaient trompés et que la planète Terre n'apparaissait pas verte (comme la chlorophylle !) mais bleue (couleur de l'oxygène), relancèrent la question de savoir pourquoi l'oxygène a pu s'accumuler dans l'atmosphère et non d'autres gaz comme le chlore : la réponse était " O_2 est inerte". Les chimistes trouvèrent l'explication à cette inertie dans la mécanique quantique et établirent des règles que nous n'aurons ni la prétention ni la suffisance de démontrer, mais que

nous acceptons comme telles et tenterons d'énoncer de manière simple et claire :

- La réaction d'une molécule à l'état triplet avec une molécule à l'état singulet est interdite :
- Les réactions d'une molécule à l'état doublet avec une molécule à l'état singulet ou avec une molécule à l'état triplet sont autorisées ;
- Les réactions entre molécules dans le même état [singulet + singulet], [doublet + doublet] et [triplet + triplet] sont autorisées.

La prise de conscience de ces règles quantiques s'est faite dans les années 60, et, en 1974, Hamilton énonce clairement : "*The direct reaction of a triplet molecule with a singlet to give products is a spin-forbidden process...*" (Hamilton, 1974). Elles ont été rappelées depuis à plusieurs reprises, mais, malgré tous les rappels, ces principes de base régissant les réactions de l' O_2 avec les molécules organiques ne sont pas enseignés.

Le contournement de l'interdiction quantique

Par interdiction quantique, l'oxygène fondamental triplet ne peut donc pas réagir avec la majorité des molécules organiques qui sont des singulets, et des intermédiaires radicalaires (doublets) doivent intervenir comme l'écrit Fridovich (1974) : "*La préférence d' O_2 pour les processus radicalaires dépend de ses 2 électrons à spins parallèles. La réaction d' O_2 , biradicalaire et paramagnétique, avec une paire d'électrons exogènes doit affronter une restriction de spin : celle-ci oppose une formidable barrière à celle-là, de par le temps requis pour une inversion de spin. Ce temps dépasse de plusieurs ordres de magnitude la durée de vie d'un complexe de collision O_2 /molécule singulet. Les mécanismes radicalaires contournent cette restriction de spin et sont dès lors toujours favorables aux réactions O_2 /molécules organiques*".

Pour lever l'interdiction quantique, il faut donc soit amener l'oxygène de l'état triplet (biradicalaire) à l'état doublet (monoradicalaire) ou à l'état singulet (non radicalaire), soit amener les molécules organiques à l'état radicalaire (doublet). Ceci permet de comprendre la raison pour laquelle,

pour enflammer un combustible, on doit le porter à une température élevée en un point (point d'ignition) où se forment alors des radicaux libres qui provoquent des réactions radicalaires en chaîne avec O_2 (combustion) (Deby *et al.*, 1991; Deby-Dupont *et al.*, 1995; Deby-Dupont *et al.*, 2002). In vivo, la barrière énergétique est franchie de manière très contrôlée, grâce aux catalyseurs biologiques que sont les oxydases et les oxygénases. Le rôle de ces enzymes est de transformer les deux partenaires, O_2 et molécule organique, de manière à ce que l'un des deux devienne doublet (radical libre) : les oxydases (exemple type : la NADPH-oxydase) font passer l'oxygène triplet au stade doublet (= anion superoxyde, à un électron célibataire), et les oxygénases (exemple : la cyclooxygénase) transforment les molécules organiques en radical libre (passage du singulet au doublet). Grâce à ces catalyseurs enzymatiques, les réactions de l'oxygène avec la matière vivante sont possibles par des voies "douces", non destructrices, procédant par paliers avec dissipation progressive de l'énergie réactionnelle, généralement reconvertie (sous forme d'ATP par exemple).

L'ÉQUILIBRE OXYDO-RÉDUCTEUR OU L'ÉTAT "RÉDOX" DE LA CELLULE.

Chaque espèce chimique possède une tendance à accepter (composé oxydant) ou à donner (composé réducteur) des électrons, caractérisée par la valeur de son potentiel électrochimique normal, E_0 , exprimé en volts (V). Toutes les espèces chimiques sont classées sur une échelle des valeurs de E_0 par rapport à un composé de référence, l'hydrogène dont $E_0 = 0$ V. Les composés les plus oxydants ont les valeurs de E_0 positives les plus élevées. Sur cette échelle, la valeur de E_0 pour $O_2 = + 1,229$ V ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$). Les espèces activées dérivées de l' O_2 sont caractérisées par une valeur d' E_0 qui permet de comparer leur pouvoir oxydant. Beaucoup d'entre elles possèdent une valeur de E_0 positive (figure 2) inférieure à celle d' O_2 ; font exception le peroxyde d'hydrogène avec une valeur positive supérieure à celle d' O_2 ($E_0 = + 1,4$ V), l'acide hypochloreux (HOCl) avec $E_0 = + 1,4$ V (pour le couple HOCl/Cl⁻) et l'anion superoxyde avec une valeur

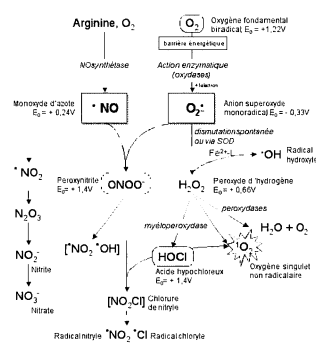


Figure 2 :
Famille des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS : reactive nitrogen oxygen species) in vivo.

A partir de l'oxygène fondamental (O₂), inactif vis-à-vis de la matière vivante (interdiction quantique de réaction), deux enzymes permettent la formation des deux espèces activées, l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote, "points d'entrée" de la cascade dont dérivent les autres RNOS.

Les [] entourent les intermédiaires réactionnels particulièrement instables.

Le fer (et les métaux de transition en général) doit être complexé par un ligand activateur (L) pour intervenir dans la cascade.

de E₀ négative (E₀ = - 0,33 V), ce qui lui confère des propriétés réductrices plutôt qu'oxydantes : la valeur de - 0,33 V a été donnée en 1965 par Sawyer (cité par Sawyer, 1991). L'oxydo-réduction met toujours en jeu un couple oxydant-réducteur dans lequel l'oxydant sera l'espèce qui possède la valeur d'E₀ la plus élevée. Certaines espèces chimiques dont l'E₀ n'est pas situé aux extrémités oxydante ou réductrice de l'échelle des potentiels électrochimiques pourront agir comme oxydant ou comme réducteur selon la valeur d'E₀ de l'espèce partenaire.

Tout milieu biologique est caractérisé par un équilibre entre espèces oxydantes et réductrices (l'état " rédox "), difficile à mesurer *in vivo*. En conditions physiologiques normales, il semble y avoir un environnement intracellulaire réducteur (études faites surtout pour le cytosol des leucocytes), dû à la présence de molécules porteuses de fonctions thiols, d'un excès de petites molécules réductrices comme le glutathion (GSH), le NADH et le NADPH, l'ascorbate, l'urate et le glucose, de composés et d'enzymes " antioxydants " et de protéines réductrices (intracytosoliques et intranucléaires) comme les thiorédoxines, les glutarédoxines et la p53 qui possède 12 cystéines (Fialkow et Downey, 1997; Kamata et Hirata, 1999; Herrlich et Bohmer, 2000). Cet état d'équilibre peut être " perturbé "

par le fonctionnement excessif des oxydases (comme la NADPH-oxydase), à l'origine d'un excès de composés oxydants qui ferait basculer l'équilibre vers un état cytosolique cellulaire oxydant (Fialkow et Downey, 1997). C'est ce déséquilibre en faveur des oxydants qui est généralement qualifié de "stress oxydant", expression d'origine anglo-saxonne (*oxidant stress*), inappropriée parce qu'elle ne tient aucun compte de l'aspect quantitatif de la production d'oxydants ni du sens originel du mot stress qui désigne l'état physiologique de l'organisme déterminé par une agression et non l'agression elle-même : l'expression " agression oxydante " serait mieux adaptée pour parler d'une production excessive de RNOS *in vivo* (dans le cas d'une activation excessive des neutrophiles par exemple).

LA PRODUCTION DES FORMES ACTIVÉES DE L'OXYGÈNE ET DE L'AZOTE IN VIVO

La famille des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote

La famille des RNOS a deux " points d'entrée " : le radical •NO produit par voie enzymatique (NO-synthétase) et l'anion superoxyde (O₂^{-•}) produit à partir d'O₂ grâce à un apport énergétique (voie enzymatique *in vivo*) qui permet de franchir l'interdiction quantique. A partir de •NO et O₂^{-•}, les autres RNOS sont produites en cascade. La filiation des RNOS est résumée dans la figure 2 et leurs effets principaux sont repris dans la figure 3.

L'anion superoxyde (O₂^{-•})

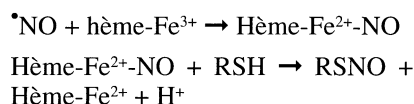
In vivo, la première étape de contournement des règles de la mécanique quantique est la réduction monoélectronique d'O₂ pour le transformer en monoradical, l'anion superoxyde. Cette étape est réalisée par des enzymes spécialisées, les oxydases (comme la NADPH-oxydase) qui apportent un électron donné par le NADPH (sous forme H[•]) et transforment l'O₂ en O₂^{-•} (Babior, 1999).

L'O₂^{-•} n'est pas un oxydant, mais plutôt un réducteur (comme le confirme sa valeur de E₀ = - 0,33 V) (Sawyer et Gibian, 1979 ; Sawyer, 1991). Il peut diffuser dans les milieux hydro-

phobes (membranes cellulaires) où il agit en désestérifiant les phospholipides (action phospholipase-like) (Deby et Goutier, 1990). En milieu aqueux, sa durée de vie est limitée à quelques millisecondes, et il est le point de départ d'une cascade de RNOS. En effet, à partir d'O₂^{-•}, on aboutit d'une part, spontanément ou par voie enzymatique (action de la superoxyde dismutase, SOD), au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'autre part au peroxydite (ONOO⁻) par réaction avec •NO (Pryor et Squadrito, 1995; Beckman et Koppenol, 1996).

Le monoxyde d'azote (•NO)

Le •NO est produit par la NO-synthétase constitutive, par oxydation de l'arginine, à un taux basal faible, et joue un rôle régulateur normal (vasodilatation, régulation d'enzymes par nitrosation/dénitrosation), mais il peut être produit en quantité plus importante par la NO-synthétase inductible (dans les situations inflammatoires notamment) (Beckman et Koppenol, 1996; Grisham *et al.*, 1999; van der Vliet et Cross, 2000). Sa diffusion intra- et extracellulaire semble libre, mais limitée par sa durée de vie très courte. Le •NO est un oxydant faible (E₀ = + 0,39 V) et n'a pas de capacité de nitration. Il est un bon agent de nitrosation en présence d'un cofacteur capable d'accepter un électron comme le métal de transition (Fe³⁺) des molécules hémiques : fixé sur un hème, le •NO est capable de provoquer la nitrosation des phénols, des thiols et des amines secondaires selon le schéma réactionnel suivant, établi pour la formation d'un nitrosothiol (Beckman 1996) :



•NO réagit aussi rapidement avec l'anion superoxyde (voir ci-dessous) et avec l'oxygène. Avec l'oxygène, il forme •NO₂ (agent nitrant), puis N₂O₃ (provenant de •NO + •NO₂) non radicalaire, mais réagissant rapidement avec H₂O pour former des nitrites et ensuite des nitrates (figure 2). L'augmentation des concentrations en nitrites et nitrates est souvent prise comme le témoin de la formation de •NO (Beckman, 1996).

Le peroxy-nitrite (ONOO⁻)

La voie de transformation la plus "dangereuse" du $\cdot\text{NO}$ est sa réaction avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ selon une vitesse de réaction limitée uniquement par la vitesse de diffusion des deux partenaires, plus grande que celle de la réaction de $\text{O}_2^{\cdot-}$ avec la SOD. Sa formation *in vivo* a été suggérée, dès 1990, dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales... et au sein de la mitochondrie (Beckman *et al.*, 1990 ; Carreras *et al.*, 1994 ; Beckman, 1996 ; Ghafourifar et Richter, 1997 ; Thom *et al.*, 1997). Il diffuse passivement via les canaux ioniques, mais sa durée de vie est extrêmement courte (< 1 seconde) au pH physiologique (où il est en équilibre avec son acide conjugué, ONOOH). Il évolue vers la formation de nitrites et de nitrates et se décompose, selon des mécanismes encore très discutés, en espèces radicalaires ($\cdot\text{OH}$ et $\cdot\text{NO}_2$) responsables de nitrations et d'hydroxylations (figure 2) (Beckman *et al.*, 1990 ; Beckman *et al.*, 1994 ; Ramezani *et al.*, 1996 ; Kissner *et al.*, 1997 ; O'Donnell *et al.*, 1999 ; Koppenol, 1999). C'est un oxydant puissant ($E_0 = + 1,4 \text{ V}$) qui réalise des oxydations à un ou 2 électrons (Kissner *et al.*, 1997). Il attaque les fonctions thiols (-SH) et -S-CH₃, les lipides, les bases nucléiques, les protéines (fonctions amines) et de nombreuses molécules de petite taille comme l'ascorbate, l'acide urique... (Beckman *et al.*, 1994 ; Quijano *et al.*, 1997 ; O'Donnell *et al.*, 1999). Il attaque les centres à métaux de transition (enzymes hémiques, SOD, hémoglobine...) (MacMillan-Crow *et al.*, 1998) et est un agent nitrant actif sur les cycles aromatiques (tyrosine, tryptophane) et donc sur les enzymes contenant des résidus tyrosyles au site actif (Ischiropoulos, 1998a). De nombreux résultats obtenus *in vitro* confirment la capacité de ONOO⁻ à réagir par voie radicalaire et à provoquer des nitrations (Mouithys-Mickalad *et al.*, 1999 ; Goldstein *et al.*, 2000) mais la nitration reste controversée (Pfeiffer *et al.*, 2001). ONOO⁻ réagit encore avec le CO₂ pour former un nitrosoperoxy-carboxylate (ONOCO₂⁻) qui évolue vers la production de $\cdot\text{NO}_2$ et CO₃⁻ (ou de NO₃⁻ et CO₂) et est responsable d'une augmentation des nitrations (Radi *et al.*, 1999 ; Radi *et al.*, 2001). ONOO⁻ et les nitrites (dérivés aussi du $\cdot\text{NO}$) peuvent réagir avec

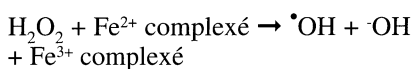
HOCl et être utilisés par la myéloperoxydase des neutrophiles pour produire des dérivés instables, capables de nitrer ou de chlorer les biomolécules (Sampson *et al.*, 1998 ; van der Vliet *et al.*, 1999 ; van der Vliet et Cross, 2000). ONOO⁻ semble aussi interagir avec des peroxydases non hémiques comme la GSH peroxydase et pourrait réagir avec $\text{O}_2^{\cdot-}$ et $\cdot\text{NO}$ (Sies *et al.*, 2000 ; Jourdeuil *et al.*, 2001).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂, est obtenu à partir d'O₂⁻ soit par dismutation spontanée soit par dismutation catalysée par la SOD. Cette nouvelle espèce n'est pas radicalaire et possède une durée de vie pouvant atteindre plusieurs minutes. H₂O₂ diffuse à partir de son lieu de production, mais est détruit par les peroxydases (glutathion peroxydase, catalase), ce qui limite son action. Son potentiel oxydo-réducteur ($E_0 = + 0,66 \text{ V}$) est moyen comparé à celui d'O₂ et de ONOO⁻, ce qui en fait un oxydant médiocre, incapable d'oxyder les fonctions thiols (Forman et Torres, 2001). Il joue un rôle important dans l'activité oxydante des leucocytes polymorphonucléaires parce qu'il est utilisé par la myéloperoxydase des neutrophiles (et par l'éosinophile peroxydase des éosinophiles) pour former l'acide hypochloreux (HOCl) (Babior, 2000). Il pourrait réagir avec les nitrites et avec ONOO⁻ pour donner des espèces nitrantes, mais cette voie reste encore hypothétique.

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

H₂O₂ est aussi à l'origine du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) s'il y a, dans le milieu, des métaux de transition complexés par un ligand activateur ; la réaction entre H₂O₂ et le Fe²⁺ complexé, selon l'équation suivante, est connue sous le nom de "réaction de Fenton" :



Pour que la réaction se poursuive, il faut que le Fe³⁺ soit ramené au stade de Fe²⁺ par des réducteurs comme O₂⁻. Mais, pour des raisons thermodynamiques, la réaction de Fenton est peu probable *in vivo* (Koppenol, 2001). Par contre, $\cdot\text{OH}$ pourrait se former lors de la décomposition du

peroxy-nitrite (voir ci-dessus). $\cdot\text{OH}$ est très réactionnel et diffuse facilement : il est théoriquement capable d'attaquer toutes les molécules (hydroxylation des cycles aromatiques, initiation des cycles de lipoperoxydation), mais son action est limitée par sa très courte durée de vie (Deby-Dupont *et al.*, 1995 ; Koppenol, 2001).

L'acide hypochloreux (HOCl)

Il est caractéristique des neutrophiles (et des éosinophiles) puisqu'il est synthétisé par la myéloperoxydase (ou par l'éosinophile peroxydase) à partir d'H₂O₂ et de Cl⁻ (Deby-Dupont *et al.*, 1999a). C'est un oxydant puissant ($E_0 = + 1,4 \text{ V}$) dont la durée de vie est longue comparée aux autres RNOS et lui permet de diffuser à distance (figures 2 et 3). Il est capable d'oxyder les structures -SH, les lipides et les fonctions amines pour donner des sulfoxydes, des chloramines et des aldéhydes toxiques (actives sur l'immunité et dans la cancérisation) (El-Hag et Clark, 1987 ; Winterbourn et Brennan, 1997 ; Prütz *et al.*, 2001). Il semble capable de réagir avec les nitrites et le peroxy-nitrite pour produire des intermédiaires instables comme NOCl et NO₂Cl qui libèrent $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$ et $\cdot\text{Cl}$ responsables de nitrosations, nitrations et chlorations. Des tyrosines chlorées et nitrées ont été mises en évidence dans les pathologies inflammatoires aiguës (Lamb *et al.*, 1999 ; Mathy-Hartert *et al.*, 2000 ; Sittipunt *et al.*, 2001) et du cholestérol chloré a été identifié dans les plaques athéromateuses (Hazen *et al.*, 1997).

L'oxygène singulet (¹O₂)

La réaction de H₂O₂ avec HOCl (réaction de Mallet) fournit l'oxygène singulet (¹O₂), une forme d'O₂ non radicalaire, obtenue par appariement des deux électrons célibataires d'O₂, appariement qui nécessite un apport d'énergie considérable et explique que ¹O₂ est très énergétique et donc très réactionnel : il réagit comme agent oxydant électrophile et peut attaquer tous les types de molécules organiques (lipides, protéines, acides aminés, hydrates de carbone, thiols, phénols, nucléotides...). Il possède une facilité particulière à former des composés d'addition avec les liaisons insaturées (les doubles liaisons car-

bone-carbone des acides gras polyinsaturés) et à conduire à la production d'hydroperoxydes et d'endoperoxydes cycliques (Kasha et Brabham, 1979; Ryter et Tyrrell, 1998). Il peut aussi être "quenché" (désactivé par transfert d'énergie sur une autre molécule) par les caroténoïdes, la bilirubine, le tocophérol et les phénols, et revenir ainsi au stade d'oxygène fondamental.

La présence d'oxygène singulet aurait été démontrée au cours de l'activation des phagocytes et attribuée à la réaction entre H_2O_2 et HOCl (Ryter et Tyrrell, 1998). L^1O_2 se formerait aussi dans les cycles de lipoperoxydation, par interaction entre lipoperoxydes (Cadenas, 1989). On pense qu'il peut se former lors de la transformation d'ONOO⁻, bien que cette voie de production soit très discutée (Khan, 1995; DiMascio *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2000). Il se forme également sous l'action de la lumière à partir de molécules photosensibilisatrices, mais cette voie de production *in vivo* reste limitée.

Les lipoperoxydes

Ils sont produits par attaque des lipides insaturés (RH) par une espèce radicalaire (figure 3). Cette attaque produit un radical (R[•]) par enlèvement d'un H[•]. La présence d'O₂, en réagissant avec le radical formé, empêche la recombinaison des radicaux entre eux, ce qui arrêterait le cycle. O₂ entraîne la formation d'un radical peroxyde (ROO[•]) qui évolue vers un hydroperoxyde lipidique (ROOH) en arrachant un H[•] à une autre molécule lipidique et en provoquant une réaction en chaîne. Les lipoperoxydes (ROOH) peuvent être réactivés en espèces radicalaires par les métaux de transition complexés (Deby-Dupont *et al.*, 1995; 2002).

Les lipoperoxydes possèdent une durée de vie longue, mais leur diffusion est limitée par leur taille et leur nature lipidique. Les phénomènes de lipoperoxydation ont des effets importants sur la stabilité et la perméabilité des membranes cellulaires.

Autres espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote

Il existent encore bien d'autres RNOS notamment des radicaux centrés sur le fer (les radicaux oxyferryles et ferryles) ainsi que des radicaux tyro-

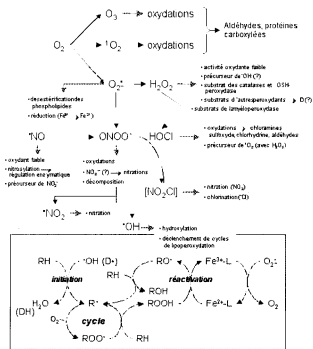


Figure 3 : Principaux effets exercés *in vivo* par les espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS). L'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3) attaquent en formant surtout des fonctions aldéhydes (sur les lipides insaturés) et carbonyles (sur les protéines, acides aminés, peptides).

*OH (?) : indique que la formation du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (par la réaction de Fenton) reste hypothétique *in vivo*. D^* : indique que l'utilisation d' H_2O_2 par certaines peroxydases (de nature hémiq : PGH-synthétase, myéloperoxydase, hémoglobine libre...) conduit souvent à produire des radicaux secondaires (D^*) à partir d'un substrat donneur d'électrons (DH).

NO_2^+ : ion nitronium; sa formation nécessite des conditions acides et reste hypothétique *in vivo* (formation possible dans le phagolysosome des neutrophiles ?).

Le cycle de lipoperoxydation est déclenché par *OH ou par d'autres radicaux formés en milieu lipidique (comme D^* formé à partir de DH). RH représente une molécule lipidique insaturée (acide gras par exemple) et R[•], RO[•], ROO[•], ROOH et ROH sont respectivement les radicaux alkyle, alkoxy et peroxy, l'hydroperoxyde et l'alcool, dérivés de RH. L : ligand activateur du fer; le complexe $Fe^{2+}-L$ permet de réactiver le cycle et l'anion superoxyde (O_2^-) peut entretenir la réactivation en réduisant le Fe^{3+} .

En l'absence d'oxygène (O_2), la dimérisation entre radicaux R[•] (peu mobiles et de courte durée de vie) arrête le cycle.

syles qui apparaissent lors du fonctionnement de certaines enzymes [prostaglandine H (PGH)-synthétase, myéloperoxydase...] et qui sont souvent le résultat d'un transfert radicalaire à partir d'un hème.

Pour la plupart, ces radicaux sont "fixés" sur une structure protéique, ce qui limite leur diffusion, mais n'empêche pas la réaction *in situ* (réactions de co-oxydations décrites pour le fonctionnement de la PGH-synthétase par exemple).

Pour terminer, il faut citer l'ozone (O_3), forme non radicalaire mais très oxydante ($E_0 = + 2,07 V$). Il se forme dans l'atmosphère sous l'effet d'un rayonnement solaire intense (UV) en présence de polluants hydrocarbonés et probablement d'ions métalliques (métaux de transition). Il se forme aussi lors des orages magnétiques. Sa

formation *in vivo* ne paraît pas possible, mais par contre, ses actions oxydantes sont importantes (au niveau pulmonaire notamment) : il attaque tous les types de molécules (formation de fonctions carbonyles sur les protéines) et particulièrement les lipides insaturés pour former des lipoperoxydes et des aldéhydes lipidiques (comme le 4-hydroxynonénal), considérés comme de bons témoins de son passage. Son action sur les lipides conduirait aux cycles de lipoperoxydations (avec formation d'espèces intermédiaires radicalaires), avec production d' H_2O_2 et d'oxygène singulet. Ses effets *in vivo* ont été particulièrement bien étudiés au niveau pulmonaire (Pryor *et al.*, 1981; Mustafa, 1990).

Les voies de production des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote *in vivo*

In vivo, en conditions normales, de nombreuses enzymes sont responsables de la production de RNOS dans le cytosol, les membranes et les mitochondries de types cellulaires variés. Il existe une production basale faible mais régulière de RNOS *in vivo* (Boveris et Chance, 1973; Chance *et al.*, 1979; Cadenas, 1989) et une production normale faible d' $O_2^{\cdot-}$ dans la mitochondrie, où il est formé par "fuite" d'électrons à partir de la chaîne des transporteurs d'électrons, au niveau de la NADH déshydrogénase, de l'intersection ubiquinone-cytochrome b, de la cytochrome oxydase (Turrens *et al.*, 1985). On estime que 2 à 3% d' O_2 sont incomplètement réduits par la mitochondrie et forment $O_2^{\cdot-}$ et son produit de dismutation H_2O_2 (Chance et Williams, 1955). La mitochondrie possède une superoxyde dismutase, rapidement inducible, capable de neutraliser $O_2^{\cdot-}$, mais elle possède aussi une NO-synthétase, ce qui permet la production intramitochondriale de peroxy-nitrite.

Les neutrophiles sont spécialement équipés pour une production importante et rapide de RNOS qu'ils utilisent normalement pour la destruction des organismes à l'intérieur du phagolysosome (Babior, 2000). Au cours de la flambée respiratoire, la NADPH-oxydase produit $O_2^{\cdot-}$ par réduction monoélectronique d' O_2 (Babior, 1999). De cette réaction dérive H_2O_2 et, du peroxyde d'hydrogène, dérive HOCl par l'action de la myéloperoxy-

dase. La production du radical $\cdot\text{OH}$ (par la réaction de Fenton en présence de Fe^{2+} complexé) est théoriquement possible, mais peu vraisemblable. Les neutrophiles possèdent également une NO-synthétase productrice de $\cdot\text{NO}$ (et de ses dérivés par réaction avec l'oxygène) auquel on attribue une action antimicrobienne (Fang, 1997). $\text{L}'\text{O}_2^{\cdot-}$ et le $\cdot\text{NO}$ peuvent ainsi se former simultanément et réagir pour donner le peroxy-nitrite (figure 2). Cette combinaison est d'autant plus probable que la NO-synthétase est maintenant reconnue comme responsable de la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ simultanément à celle de $\cdot\text{NO}$ (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). De nombreuses autres cellules possèdent une activité de NADPH-oxydase et de NO-synthétase (monocytes, macrophages, lymphocytes, fibroblastes, cellules endothéliales ...) (Meyer *et al.*, 1999; Griendling *et al.*, 2000). Dans ces cellules, la "NADPH-oxydase" aurait une activité normale modérée assurant la production des espèces activées de l'oxygène comme seconds messagers et régulant ainsi les réponses de croissance cellulaire (Babior, 1999; Thannickal et Fanburg, 2000). Des RNOS sont également produites dans la plupart des cellules durant le fonctionnement de nombreuses oxydases et oxygénases, comme les enzymes du réticulum endoplasmique (*mixed function oxidases*) et les enzymes cytosoliques (xanthine oxydase, lipoxigénases, PGH-synthétases), mais cette production, en conditions normales, se fait à un niveau réduit et contrôlé par le site enzymatique et la structure protéique de l'enzyme.

La principale forme de toxicité de l'oxygène se trouve dans sa capacité à entretenir les réactions radicalaires. Lorsqu'une molécule passe à l'état radicalaire (exemple de R^\cdot sur le cycle de lipoperoxydation de la figure 3), la disparition des radicaux se fera par leur recombinaison avec arrêt de la réaction. La présence ubiquitaire d' O_2 empêche cette recombinaison. Le radical formé réagit avec O_2 pour produire de nouveaux radicaux et déclencher une réaction en chaîne comme par exemple la peroxydation des lipides (Deby *et al.*, 1995 ; Deby-Dupont *et al.*, 1995).

La production de RNOS est accrue dans des situations pathologiques comme l'inflammation aiguë, par l'activation excessive des neutro-

philes et l'induction d'enzymes comme les NO-synthétase et PGH-synthétase inductibles. Des augmentations de production d'espèces activées de l'oxygène existent dans l'hyperoxie, mais aussi, paradoxalement, dans les situations d'hypoxie ou d'ischémie suivie de reperfusion où leur formation semble consécutive aux altérations subies par les mitochondries et à l'activation intracellulaire de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase productrice d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Fridovich, 1978 ; McCord, 1987 ; Sanders *et al.*, 1993 ; Slater *et al.*, 1995 ; Zulueta *et al.*, 1995 ; Kazzaz *et al.*, 1996 ; Deby-Dupont *et al.*, 1999b ; Zulueta *et al.*, 2002).

Les RNOS agissent de manière non spécifique de sorte que les cibles atteintes sont variées et que toutes les molécules sont des cibles potentielles : protéines, lipides, hydrates de carbone, acides nucléiques. Il y a cependant des cibles plus sensibles : les lipides insaturés, certains acides aminés et composés aromatiques, les fonctions -SH et même $\text{CH}_3\text{-S-}$. Le tableau I reprend les principales voies de la toxicité des RNOS.

Les défenses naturelles contre les formes activées de l'oxygène sont des enzymes spécialisées (superoxyde dismutase pour l'anion superoxyde, catalase pour H_2O_2 , glutathion peroxydase pour les peroxydes...), des protéines qui modulent les actions du fer en réalisant son oxydation en Fe^{3+} (céruleoplasmine), en assurant son transport et son stockage (transferrine, ferritine), en éliminant ses formes complexées (notamment la forme hémique de l'hémoglobine) plasmatiques et intracellulaires (haptoglobine, hème-oxygénase...), et des molécules variées de faible masse moléculaire (glutathion, vitamine E, acide urique...), globalement dénommées "antioxydants" mais pour lesquelles l'appellation "inhibiteurs actifs sur l'équilibre rédox" (*redox active inhibitors*) utilisée par Holland et collaborateurs (2000) conviendrait mieux. En effet, cette dénomination rappelle que l'activité de ces molécules est dépendante de l'équilibre oxydo-réducteur du milieu et des valeurs de E_0 des partenaires réactionnels. Les enzymes agissent par voie catalytique de sorte qu'une molécule d'enzyme est capable de neutraliser quelques centaines, voire quelques milliers, de molécules toxiques. Les "antioxydants" agis-

sent de manière stœchiométrique, avec neutralisation d'une ou de quelques espèces dangereuses par molécule d'antioxydant (Deby *et al.*, 1995). Leur efficacité est ainsi limitée par l'importance et le lieu de production des espèces toxiques : la vitamine E est active en milieu lipophile, tandis que le GSH est efficace en milieu hydrophile et est oxydé en dimère GSSG. Après réaction, la vitamine E, devenue radicalaire, pourrait être régénérée par la vitamine C. Au nombre des défenses naturelles contre les espèces oxydantes, il faut compter les enzymes "réductrices" qui ramènent à l'état réduit des composés qui ont réagi avec les RNOS; parmi ces enzymes, citons la glutathion réductase (qui réduit GSSG en GSH) et les thiorédoxines réductases (Mustachich et Powis, 2000).

L'OXYGÈNE ET LES ESPÈCES ACTIVÉES DÉRIVÉES DE L'OXYGÈNE ET DE L'AZOTE DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE

Il existe dans la cellule une adaptation à l'oxygène et aux variations de sa concentration (hypoxie ou hyperoxie) qui se traduisent par des risques de production de RNOS. Cette adaptabilité suppose l'existence intracellulaire d'un mécanisme "senseur d'oxygène" qui déclenche la réaction cellulaire en cas d'hypoxie ou d'hyperoxie, par des réponses aiguës en situation d'urgence ou par des réponses lentes en situation chronique. Ces réponses font appel à l'activation de gènes codant pour des molécules de défense (molécules réductrices, enzymes de destruction spécifique des RNOS) et donc à la mise en route des mécanismes de la transduction du signal (Forman et Torres, 2001; Lopez-Barneo *et al.*, 2001).

Dualité du rôle des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote

En conditions physiologiques, les RNOS seront des éléments normaux ("seconds messagers") qui régulent la signalisation intracellulaire. Elles possèdent certaines des caractéristiques classiques attribuées aux seconds messagers: production locale rapide par mécanismes enzymatiques régulés, dégradation rapide par voie enzymatique, diffusion limitée par leur courte durée de vie et spécificité

d'action due à la localisation de leur production associée à une réaction rapide. En modifiant l'équilibre oxydo-réducteur des milieux biologiques, elles interviennent dans les mécanismes de régulation cellulaire. Dans de nombreuses cellules, les RNOS semblent produites normalement, lors d'une stimulation de la cellule par des cytokines et des facteurs de croissance agissant via des récepteurs à tyrosine kinase ou couplés aux protéines G (Sundaresan *et al.*, 1995 ; Suzuki *et al.*, 1997 ; Irani, 2000 ; Thannickal et Fanburg, 2000), par activation (Ca²⁺-dépendante) des enzymes " NAD(P)H-oxydases like " qui produisent O₂^{•-} (d'où dérive H₂O₂), enzymes dont la présence est admise dans un nombre de plus en plus grand de cellules : lymphocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules vasculaires lisses (SMC: *smooth muscle cells*)... (Meyer *et al.*, 1999 ; Griendling *et al.*, 2000 ; Hensley *et al.*, 2000 ; Holland *et al.*, 2000). Par cette voie de production, les RNOS auraient un rôle dans la croissance cellulaire et même dans la protection contre l'apoptose (Irani, 2000). Leur activité constitue un mécanisme commun à la transcription de nombreux gènes (Sen et Packer, 1996) en cofonctionnement avec les protéines tyrosine kinases et phosphatases et les voies de signalisation dépendantes des lipides et du Ca²⁺ (Kamata et Hirata, 1999). Les fonctions régulatrices de faibles (*sub-toxic*) concentrations en RNOS dans la signalisation cellulaire sont démontrées indirectement par le phénomène d'adaptation à l'exposition aux RNOS, comme l'adaptation à l'hypoxie expliquée par l'induction d'enzymes antioxydantes sous l'effet des RNOS (Deneke et Fanburg, 1980 ; Clerch et Massaro, 1993).

Lorsqu'elles sont produites en quantité suffisante pour dépasser les capacités réductrices (situation habituellement mais improprement qualifiée de " stress oxydant "), les RNOS conduisent à la prolifération cellulaire excessive (hypertrophie des cellules musculaires lisses), aux perturbations de la signalisation cellulaire et aux altérations de l'ADN, conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose. Elles ont donc un double rôle selon l'importance de leur production et selon leur nature. De nombreuses données expérimentales permettent effectivement de relier les

perturbations de l'état rédox à la régulation de la transduction du signal et, par cette voie, on relie la production d'espèces oxydantes en excès au développement de nombreuses pathologies, depuis le vieillissement jusqu'aux maladies neurodégénératives en passant par les pathologies inflammatoires chroniques et aiguës (Fialkow et Downey, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1997 ; Hensley *et al.*, 2000 ; Pani *et al.*, 2000).

Un effet " collatéral " du développement récent des connaissances sur le rôle des RNOS dans la signalisation a été de prôner de nouvelles stratégies pharmacologiques visant à augmenter le " potentiel de défense antioxydante " pour prévenir ou traiter les pathologies considérées comme liées à une production excessive de RNOS, y compris la maladie d'Alzheimer. Mais, la majorité des données actuelles dérivent des recherches fondamentales, aux résultats parfois opposés, obtenus dans des conditions de travail fort éloignées des situations *in vivo*. La compréhension des mécanismes d'action des RNOS reste fragmentaire et de nombreuses inconnues subsistent sur les mécanismes et les conséquences exactes de l'activation de la transduction du signal par les RNOS. Le cas des facteurs de transcription nucléaires de la famille NF-κB/Rel (NF = *nuclear factor*) peut être pris comme exemple : dès le début des années '90, les RNOS ont été considérées comme activatrices du facteur de transcription nucléaire NF-κB amenant sa fixation sur l'ADN et l'expression de nombreux gènes (codant notamment pour des médiateurs inflammatoires) (Schreck et Baeuerle, 1991). Les avis sont maintenant plus nuancés : les RNOS pourraient amener la fixation de NF-κB sur l'ADN, sans induire l'expression des gènes (True *et al.*, 2000). Elles accompagneraient l'activation de NF-κB sans en être nécessairement les déclencheurs, selon le type cellulaire et la nature des RNOS étudiées (Bowie et O'Neill, 2000).

Les résultats publiés sont fréquemment remis en question quelque temps plus tard. La majeure partie des connaissances résultent de travaux de laboratoire, fort éloignés des conditions *in vivo*, réalisés sur bactéries, virus, lignées cellulaires continues et animaux *knockout* pour certains gènes, la plupart du temps en conditions " dures " (addition de concentra-

tions élevées en RNOS fort éloignées des concentrations atteintes *in vivo*) ou par études " indirectes " démontrant un effet négatif sur la transduction du signal par utilisation d'inhibiteurs enzymatiques (qui agiraient sur les enzymes productrices de RNOS) ou d' " antioxydants " (qui neutraliseraient les RNOS). L'identification des RNOS produites dans la cellule et considérées comme intervenant dans l'activation de la signalisation est généralement non spécifique, comme la mesure d'une fluorescence intracellulaire due à l'oxydation de la 2',7'-dichlorofluoresceine en 2',7'-dichlorofluorescéine et présentée comme témoin sensible d'une production d'H₂O₂. En l'absence d'une peroxydase, H₂O₂ seul ne peut attaquer la dichlorofluoresceine, mais d'autres RNOS (ONOO-, •OH...) et d'autres agents oxydants peuvent réaliser cette oxydation : cette méthode peut donc indiquer une production d'agents oxydants et de RNOS, mais pas celle d'une espèce oxygénée activée spécifique (Lebel *et al.*, 1992 ; Chandel et Schumacker, 2000). Les inhibiteurs enzymatiques utilisés ne sont généralement pas spécifiques, comme le diphenyliodonium (DPI) ajouté pour inhiber la NADPH-oxydase mais qui est aussi un inhibiteur de la NO-synthétase et des enzymes flaviniques en général (Hancock et Jones, 1987 ; Zulueta *et al.*, 2002), et les molécules (réellement ou considérées comme) " antioxydantes " (telles que la N-acétylcystéine, la pyrrolidine dithiocarbamate...) peuvent ne pas atteindre le site de production des RNOS (phase lipidique ou aqueuse), avoir une cinétique de réaction trop lente ou avoir des effets inattendus. Ainsi, dans l'activation du NF-κB par les RNOS, l'utilisation d'antioxydants exerce un rôle négatif en " bloquant " ou " ralentissant " l'activation du NF-κB par les RNOS. Certains travaux ont montré, au contraire, que des " antioxydants " comme le butylhydroxyanisole (BHA) et la pyrroline dithiocarbamate sont capables d'activer par eux-mêmes l'expression génique dépendante de NF-κB. Cette contradiction semble disparaître si l'on considère les données d'un travail montrant que le BHA produit lui-même des espèces radicalaires (démonstration donnée par utilisation de la technique spécifique de résonance paramagnétique électronique), et que c'est sans doute par cette voie qu'il favorise l'activation des facteurs nucléaires NF-κB et

AP-1 (Pinkus *et al.*, 1996).

Ces quelques exemples soulignent la difficulté du sujet et la nécessité de poursuivre les recherches fondamentales en affinant les techniques d'identification des RNOS impliquées et de compréhension de leur mode d'action. Les recherches de base restent indispensables avant de pouvoir envisager une thérapeutique par "antioxydants" bien ciblée et efficace (Hensley *et al.*, 2000; Lockshin, 2000). Jusqu'à présent, les essais de thérapeutiques "antioxydantes" *in vivo* sont globalement décevants (MacNee, 2001).

Cibles et mécanismes d'action des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote dans la signalisation cellulaire

D'une manière générale, on peut affirmer que les RNOS, selon leur endroit de production et leur nature, agissent sur des molécules intervenant à différents niveaux dans la transduction du signal, avec des effets variables selon la cellule, tantôt activateurs tantôt inhibiteurs, expliquant par là les apparentes contradictions relevées dans la littérature scientifique et la variabilité des effets produits par les molécules utilisées comme antioxydants. Les données de la littérature de ces dix dernières années indiquent que les RNOS (et avec eux les métaux de transition complexés) agissent sur les récepteurs membranaires, les récepteurs tyrosine kinases, les protéines adaptatrices et effectrices, les métabolites des phospholipides comme le diacylglycérol, les éléments de la voie du Ca^{2+} , les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), les facteurs de transcription nucléaire (c-Jun, NF- κ B, AP-1, p53, HIF-1a...), les phosphatases, les caspases, les mitochondries, la membrane et les protéines nucléaires, l'ADN lui-même.... (Thannickal et Fanburg, 2000 ; Forman et Torres, 2001).

Les fonctions thiols, présentes sur les protéines, joueraient un rôle majeur dans les interactions avec les RNOS. Mais, il est encore impossible de préciser si les RNOS modifient directement les molécules impliquées dans la transduction du signal ou si elles provoquent une consommation des éléments réducteurs et font "basculer" le potentiel oxydo-réduc-

teur du milieu, entraînant l'activation de la cascade de la transduction du signal. Dans certains cas, on a montré que le passage d'une protéine de l'état réduit à l'état oxydé peut s'accompagner d'une modification de conformation qui lui permet alors de se fixer sur une région spécifique de l'ADN, d'interagir avec des récepteurs ou de modifier l'activité d'enzymes (Storz *et al.*, 1990).

Certains auteurs mentionnent des cibles différentes suivant le type de RNOS (Irani, 2000; Lee et Shacter, 2000). HOCl, par exemple, est actif sur les facteurs de transcription nucléaire (Schoonbroodt *et al.*, 1997). Les aldéhydes dérivés de la lipoperoxydation (comme le 4-hydroxynonéal) activent la voie des MAPKs et certains facteurs de transcription comme l'AP-1 (Leonarduzzi *et al.*, 2000). L'oxygène singulet serait un agent effecteur de l'expression génique chez les eukaryotes, actif sur l'expression d'enzymes (comme l'hème oxygénase), de protéines (comme les *heat shock* protéines), de molécules d'adhésion, de cytokines, de métalloprotéases matricielles, et sur l'activation des facteurs de transcription nucléaire (Legrand-Poels *et al.*, 1995 ; Ryter et Tyrrell, 1998). Les avis sont partagés sur les effets du $^{\bullet}NO$, sur ses interactions avec les centres à fer ou autre métal de transition et sur la formation des cystéines nitrosées qui agiraient comme des régulatrices normales de la transcription et de l'apoptose (Mannick *et al.*, 1999). Les études sur les effets du peroxy-nitrite et des nitrations connaissent des débuts prometteurs (Go *et al.*, 1999). Quant au rôle des dérivés chlorés qui pourraient se former par les interactions du peroxy-nitrite ou des nitrites avec HOCl dans certaines circonstances (présence de la myéloperoxydase), quasiment tout reste à étudier.

Les mécanismes d'action des RNOS peuvent se diviser en deux groupes : l'altération de l'état rédox intracellulaire et la modification oxydative des protéines et autres molécules intervenant dans les cascades de la signalisation. Les milieux biologiques intracellulaires paraissent normalement réducteurs, grâce à la présence de composés de faible masse moléculaire porteurs de fonctions thiols (comme le glutathion), de NADH et NADPH, de molécules de masse moléculaire élevée riches en -SH, de

petites molécules redox active (ascorbate, urate, glucose...), de protéines et peptides réducteurs comme les thiorédoxine et glutarédoxine ainsi que des enzymes de réduction comme la GSH réductase et les thiorédoxine réductases (Mustachich et Powis, 2000 ; Forman et Torres, 2001). Ces éléments réducteurs joueraient un rôle intracellulaire capital dans l'inhibition d'activation des facteurs nucléaires induite par les RNOS, rôle qui est particulièrement étudié pour le glutathion (Haddad *et al.*, 2000 ; Rahman *et al.*, 2001).

Les modifications oxydantes des éléments de la cascade de la transduction du signal varient avec la nature de l'espèce oxydante. L'anion superoxyde pourrait agir en milieu lipidique par ses fonctions de désestérification, favorisant la formation de métabolites lipidiques actifs. Le $^{\bullet}NO$ agirait sur les centres à fer et par formation de dérivés nitrosés (régulation des caspases par nitrosation) ou du peroxy-nitrite qui agirait par nitration des résidus tyrosyles, interférant ainsi avec la phosphorylation. D'une manière générale, les RNOS agissent sur des cibles sensibles comme les lipides insaturés, les acides aminés aromatiques, les cystéines, les complexes métalliques (structures Fe-S des métalloenzymes). Le point commun de nombreuses protéines sensibles aux RNOS est la présence d'un domaine de régulation activé par phosphorylation (présence fréquente d'un résidu tyrosyle). Lorsque ce domaine est altéré, la phosphorylation est perturbée et la transduction du signal est modifiée (Suzuki *et al.*, 1997 ; Thannickal et Fanburg, 2000). Les RNOS agissent ainsi sur les deux classes d'enzymes qui régulent la phosphorylation, les protéines kinases et les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) par altération des sites de phosphorylation (tyrosine et sérine/thréonine) (Suzuki *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998). Les RNOS altèrent aussi bien les protéines kinases impliquées dans la prolifération cellulaire et qui sont activées par les facteurs de croissance (les MAPKs) (Sundaresan *et al.*, 1995) que les protéines kinases activées par le stress (SAPK, *stress activated protein kinases*) (Kyriakis et Avruch, 1996). Dans le noyau, les RNOS provoqueraient des ruptures des brins d'ADN, entraînant l'activation de la poly(ADP-ribose) polymérase

(PARP) qui consomme le NAD⁺ et contribue à la chute du taux d'ATP (Lee *et al.*, 1998).

Les cystéines sont des points fragiles, surtout si cet acide aminé est localisé au site catalytique d'une enzyme ou dans la région de fixation d'un facteur de transcription à l'ADN. La majorité des protéines et facteurs de transcription sensibles aux RNOS possèdent des résidus cystéines sensibles aux variations du potentiel rédox de l'environnement. Les PTPs, par exemple, possèdent une cystéine au site actif (Suzuki *et al.*, 1997). Mais on connaît mal les mécanismes par lesquels les modifications de ces cystéines peuvent aboutir à l'activation moléculaire. Une séquence d'acides aminés sensible serait la séquence PEST (proline, acide glutamique, sérine, thréonine) située dans le domaine ODD (*oxygen dependent degradation domain*) de certains facteurs de transduction comme HIF-1a, induit par l'hypoxie (Jewell *et al.*, 2001).

Le NF-κB est un facteur de transcription nucléaire impliqué dans la réaction inflammatoire et dans la survie cellulaire et dont l'activation par les RNOS est démontrée, même si les mécanismes d'action et la nature des RNOS impliquées restent imprécis (Baichwal et Bauerle, 1997 ; Schoonbroodt *et al.*, 1997 ; Bowie et O'Neil, 2000 ; Quinlan *et al.*, 2001). L'activation du NF-κB nécessite la dégradation de l'IκBα phosphorylée qui libère le facteur nucléaire et lui permet de pénétrer dans le noyau. Dans certains types cellulaires, les RNOS agiraient sur la libération du NF-κB de son complexe avec l'IκB via une action sur les protéines kinases et les phosphatases et sur sa liaison avec l'ADN par action sur ses fonctions -SH. En effet, par des études *in vitro* sur des systèmes simplifiés, on sait que la liaison d'un facteur de transcription à l'ADN induit des changements de conformation de la protéine, du site de l'ADN visé ou des deux à la fois, et que des résidus cystéine critiques interviennent au niveau de la liaison des facteurs de transcription sur l'ADN (Brennan et O'Neill, 1996). Les fonctions thiols sont réputées sensibles à l'action des RNOS, notamment par nitrosation (DelaTorre *et al.*, 1997 ; Marshall *et al.*, 2000). Dans les voies de transduction du signal dépendantes des cytokines pro-inflammatoires ou des mitogènes, la phosphorylation d'IκBα

se produit sur les résidus sérine 32 et 36 de la partie N-terminale. Sous l'effet des RNOS (comme H₂O₂ sur une lignée lymphocytaire T), il y aurait plutôt phosphorylation d'un résidu tyrosine (Tyr 42) et des résidus sérine/thréonine de la partie PEST C-terminale d'IκBα (Schoonbroodt *et al.*, 2000). Dans d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales bronchiques, les RNOS pourraient avoir des actions opposées en augmentant l'activité des IκB kinases, mais en inhibant la dégradation protéosomale (Jaspers *et al.*, 2001). La figure 4 résume les sites d'action possibles des RNOS dans la transduction du signal.

Rôle particulier des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote dans la transmission du signal dans les leucocytes

Dans les leucocytes (lymphocytes, monocytes/macrophages, neutrophiles, éosinophiles), les RNOS agissent sur la régulation des récepteurs, les activités enzymatiques, la liaison des facteurs de transcription et l'expression des gènes (Fialkow et Downey, 1997 ; Pani *et al.*, 2000 ; Forman et Torres, 2001). Ces cellules expriment toutes la NADPH-oxydase à des degrés divers, et la NO-synthétase. Ces deux enzymes sont responsables des premières étapes du métabolisme de l'oxygène c'est-à-dire la formation de l'anion superoxyde et du *NO. Monocytes/macrophages et neutrophiles, mis en contact avec des stimuli activateurs, répondent par un métabolisme oxydant important caractérisé par une augmentation brutale de la consommation d'oxygène

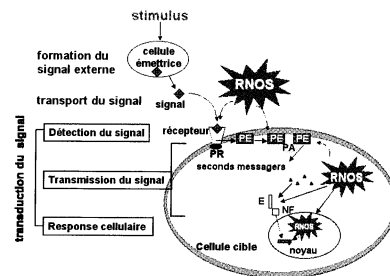


Figure 4 :
Les principaux sites d'action des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS) dans la transduction du signal. Ces sites sont la membrane cellulaire, les récepteurs membranaires, les protéines intra-cytoplasmiques associées au récepteur (PR), les protéines effectrices (PE) et adaptatrices (PA), les enzymes (E) des cascades de la transduction, les facteurs nucléaires (NF), la membrane nucléaire et l'intérieur du noyau (ADN et protéines nucléaires).

(flambée respiratoire), particulièrement dans les neutrophiles, une situation "indépendante" de la signalisation intracellulaire, normalement destinée à assurer la phagocytose avec dégradation des microorganismes envahisseurs (Fang, 1997 ; Babior, 1999 ; Babior, 2000). Mais, il semblerait que les RNOS produites au cours de la flambée respiratoire puissent exercer une activité modulatrice sur l'expression des cytokines, chémokines, molécules d'adhésion et médiateurs inflammatoires (via l'activation de la cascade des MAPKs et du NF-κB) et sur le ralentissement de l'apoptose des neutrophiles (Schwartz *et al.*, 1996 ; Matute-Bello *et al.*, 1997 ; Forman et Torres, 2001).

A côté de cette production de RNOS destinée à assurer la phagocytose, il existerait dans les leucocytes une production de RNOS plus "modeste", normale, impliquée dans la régulation du signal intracellulaire, déclenchée par différents stimuli (comme la fixation d'un ligand sur son récepteur membranaire) et assurant la transmission du signal nécessaire aux différentes fonctions métaboliques des leucocytes.

Parmi les effets attribués aux RNOS dans les leucocytes, citons :

- l'action sur la phosphorylation des tyrosines conduisant à la modulation des voies dépendantes de cette phosphorylation, à la fois en activant les tyrosine kinases et en inhibant les tyrosine phosphatases (Pani *et al.*, 2000 ; Sahan *et al.*, 2000). Les effets des RNOS à ce niveau ont des conséquences dans différentes directions puisque la phosphorylation des tyrosine kinases est le point de départ de la régulation de nombreuses fonctions leucocytaires (Fialkow et Downey, 1997) ;
- la modulation de la fonction des récepteurs Fc et de la phagocytose. Les neutrophiles expriment deux types de récepteurs Fc, responsables de la reconnaissance des microorganismes opsonisés et du signal transmembranaire conduisant à l'internalisation et à la destruction du microorganisme. Les RNOS agissent (outre leur action dans le phagolysosome) en pontant un des récepteurs Fc, ce qui conduit à activer l'autre. Il s'agit ici d'un effet autocrine des RNOS ;
- la polymérisation de l'actine et la

mobilité cellulaire. H₂O₂ provoque des modifications du cytosquelette des macrophages en augmentant la polymérisation de l'actine. La polymérisation de l'actine dans les macrophages et les lymphocytes passe également par la phosphorylation des tyrosines, modulée elle-même par les espèces oxydantes ;

- l'activation de la cascade des MAP kinases. Dans les macrophages, cette cascade MAP kinase active le facteur de transcription c-Jun, et active la phospholipase A2 (laquelle, via la libération d'acide arachidonique et la production de prostanoïdes, agirait sur la polymérisation de l'actine et donc sur le cytosquelette) ;
- régulation de l'apoptose qui serait induite par activation de la phosphorylation des tyrosines, notamment dans les neutrophiles et les éosinophiles ;
- la régulation de l'expression des gènes. Les RNOS agirait sur les facteurs de transcription nucléaires. L'activation de NF-κB est liée à la réponse inflammatoire par son effet activateur de l'expression de gènes liés à cette réaction inflammatoire ; NF-κB se trouve dans les lymphocytes, les macrophages et les monocytes ;
- les effets paracrines. Les RNOS, lors du fonctionnement excessif de la NADPH-oxydase dans les neutrophiles, peuvent être libérés dans le milieu extra-cellulaire et activer d'autres cellules situées dans un environnement proche : les cellules endothéliales peuvent être des cibles de choix (Benbarek *et al.*, 2000) et les fonctions des lymphocytes peuvent être modulées par HOCl (El-Hag et Clark, 1987).

RÔLE DES ESPÈCES ACTIVÉES DÉRIVÉES DE L'OXYGÈNE ET DE L'AZOTE DANS L'APOPTOSE

Les RNOS interviendraient dans l'activation de l'apoptose, et, comme dans la transduction du signal, leur rôle peut être double ici aussi. L'agression oxydante, c'est-à-dire la production brutale et importante de RNOS, en amenant des perturbations de l'équilibre rédox, entraîne la mort de la cellule par nécrose à la suite d'altérations aiguës des fonctions cellulaires, avec une perte rapide du contenu cellulaire en ATP. La mort

par nécrose présente des caractéristiques morphologiques de gonflement cellulaire et de rupture de membrane, avec dispersion du contenu cellulaire toxique pour les cellules voisines ou attracteur des cellules pro-inflammatoires (les phagocytes), et donc avec réaction inflammatoire. Lorsque les concentrations en RNOS sont plus faibles, il y aurait mort par apoptose sans inflammation et sans activation du métabolisme oxydant des phagocytes. Les RNOS sont ainsi présentés comme des médiateurs endogènes normaux de l'apoptose (secondes médiateurs) et certaines observations confirment ce point de vue : la chute des pools de GSH dans l'apoptose liée à la production de RNOS, la capacité de la catalase à bloquer l'apoptose, l'attribution d'une activité "antioxydante" aux facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et p35, et le rôle attribué aux phénomènes oxydants sélectifs dans l'altération de la surface membranaire et dans l'"externalisation" de la phosphatidylsérine (Kagan *et al.*, 2000). Cette "externalisation" est considérée comme un marqueur membranaire de l'apoptose permettant de désigner aux macrophages la cellule à éliminer (Savill, 1997).

Parmi les voies de régulation de l'apoptose (Savill, 1997 ; Ischiropoulos, 1998b), la voie mitochondriale prend une importance croissante, via la libération du cytochrome c et le statut oxydo-réducteur de la mitochondrie et de la cellule (Hancock *et al.*, 2001). La mitochondrie est considérée comme un organe "senseur" d'O₂ ("électrode à oxygène" naturelle) couplé à la transduction du signal. En réponse à l'hypoxie, elle augmenterait la production de RNOS intervenant comme seconds messagers et déclenchant une réponse adaptative (Chandel *et al.*, 2000).

Sur les membranes des mitochondries, les RNOS agirait en provoquant l'oxydation de composés lipidiques (comme les cardiolipines), une rupture du potentiel membranaire et une libération du cytochrome c. Si la capacité réductrice du milieu environnant (où le GSH paraît jouer un rôle majeur) est altérée, le cytochrome c passerait à l'état oxydé et déclencherait les mécanismes de l'apoptose (Nomura *et al.*, 2000 ; Hancock *et al.*, 2001). Dans cette perspective d'un effet initiateur des

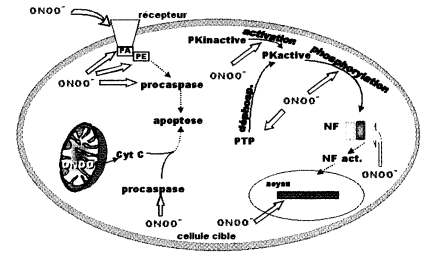


Figure 5 :
Rôle potentiel du peroxyde d'azote (ONOO-) dans la transduction du signal et l'apoptose.

ONOO- agirait par oxydations des structures à -SH et à -S-CH₃, hydroxylations et nitrations (cycle aromatique de la tyrosine). PK: protéine kinase; PTP: protéine tyrosine phosphatase; PE: protéine effectrice; PA: protéine adaptatrice; NF: facteur nucléaire (act.: activé).

RNOS sur la libération du cytochrome c, l'action désestérifiante de l'anion superoxyde (produit normalement en quantité limitée et contrôlée par la mitochondrie, mais augmenté en situation d'anoxie ou d'hyperoxie) doit être ré-évaluée. Le cytochrome c libéré forme le complexe cytochrome c-Apaf-1 procaspase 9 (figure 5) qui conduit à l'activation en caspase 9 par apport d'énergie due à l'hydrolyse de l'ATP (Richter *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 2000). Mais il faut que subsiste une concentration suffisante en ATP pour que l'apoptose puisse se produire (Lelli *et al.*, 1998). Si le taux d'ATP est trop faible, il y aura nécrose et donc réaction inflammatoire. Ce point de vue s'applique particulièrement bien à l'anoxie où les concentrations en ATP s'effondrent.

La mitochondrie joue ainsi un rôle majeur dans l'apoptose comme celle-ci de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 qui peut bloquer la libération du cytochrome c pro-apoptotique. Lorsque des espèces réactives sont produites dans la mitochondrie, elles peuvent réagir avec des groupes prosthétiques et des résidus aminés et initier la libération de facteurs apoptogènes. Le *NO est une de ces espèces actives qui peut protéger ou induire l'apoptose selon sa concentration et sa cible, et en fonction de la présence d'autres espèces activées comme l'anion superoxyde et d'une formation éventuelle de peroxyde d'azote. Les faibles doses de *NO protègent les lymphocytes B contre l'apoptose induite par l'infection virale ou l'activation des récepteurs, tandis que des doses élevées de *NO induisent l'apoptose dans les macrophages, les hépatocytes, les cellules gliales et les neurones. La concentra-

tion en $\cdot\text{NO}$ joue ainsi un rôle essentiel non seulement dans les cellules bien équipées en NO-synthétase constitutive comme les neurones et les cellules endothéliales, mais surtout dans les cellules comme les hépatocytes, les chondrocytes, les astrocytes et les macrophages qui répondent aux cytokines proinflammatoires et à d'autres agressions cellulaires (anoxie, hypoxie, produits bactériens...) par l'induction d'une NO-synthétase produisant des concentrations importantes de $\cdot\text{NO}$. Ces concentrations peuvent devenir cytotoxiques, surtout si, simultanément, l'anion superoxyde est formé par le système NADPH-oxydase (Bosca et Hortelano, 1999). Il en résultera une synthèse accrue de ONOO \cdot . Le $\cdot\text{NO}$ réagit directement avec des protéines hémiques, des protéines à fer et soufre et les thiols réduits, composés impliqués dans la transduction du signal. La mitochondrie est riche en protéines hémiques et en protéines à fer-soufre. Ces réactions sont réversibles. Par contre, la réaction de ces molécules avec le peroxy-nitrite est irréversible. Dans la mitochondrie, le $\cdot\text{NO}$ inhibe de nombreuses enzymes, les complexes I et IV, la cytochrome oxydase, l'aconitase. Le ONOO \cdot s'attaque à l'aconitase et aux complexes I et II. La perte de fonction des mitochondries réduit le potentiel rédox de la cellule et entraîne une perte énergétique (Lin *et al.*, 1998).

Mais, comme pour la transduction du signal, certains résultats sont contestés par d'autres travaux, et plusieurs observations indiquent même que certaines espèces radicalaires pourraient atténuer l'apoptose (Chandra *et al.*, 2000) ou que les RNOS seraient une conséquence du déclenchement de l'apoptose et non sa cause. Au niveau de la mitochondrie par exemple, des travaux (Cai et Jones, 1998) ont remis en cause le rôle "antioxydant" attribué au facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Hockenbery *et al.*, 1993 ; Kane *et al.*, 1993) et montré que les modifications du potentiel oxydo-réducteur intramitochondrial suivent la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase 3, de sorte que la production des RNOS est une conséquence et non l'initiateur de l'apoptose induite par la voie mitochondriale. L'oxydation sélective de la phosphatidylsérine (anionique) se ferait par interaction

Tableau I : Production des espèces activées dérivées de l'oxygène et de l'azote (RNOS) et leurs principaux effets in vivo.

<p>• Lieu de production des RNOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - dans les mitochondries (taux basal faible en conditions normales, production accrue en anoxie ou en hyperoxie) - par les phagocytes (neutrophiles et macrophages alvéolaires) : production excessive et incontrôlée dans les réactions inflammatoires aiguës - dans le réticulum endoplasmique - dans le cytosol (enzymes constitutives ou induites)
<p>• Rôle physiologique normal</p> <ul style="list-style-type: none"> - destruction des microorganismes lors de la phagocytose (lutte anti-infectieuse) - régulation de l'équilibre oxydo-réducteur et rôle de seconds messagers dans la signalisation intracellulaire - rôle dans la régulation de l'apoptose
<p>• Rôle pathologique : altérations cellulaires</p> <ul style="list-style-type: none"> - altérations protéiques (oxydations des fonctions -SH, carbonylations...) - altérations de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale - altérations de l'ADN (oxydation des bases nucléiques, cassures monobrin) - lipoperoxydation membranaire (altérations de la perméabilité cellulaire) - altérations de la synthèse protéique et des fonctions enzymatiques

avec le cytochrome c cationique libéré par la mitochondrie en souf-france.

Le rôle et les modes d'action des RNOS dans l'apoptose restent donc largement controversés, controverses que seules de nouvelles recherches fondamentales pourront résoudre (Ren *et al.*, 2001).

CONCLUSION

In vivo, dans la cellule, il existe un équilibre entre oxydants et réducteurs (équilibre rédox), normalement en faveur des réducteurs. Des enzymes spécialisées permettent la production de RNOS, en faibles doses, actives dans l'homéostasie cellulaire, production qui est normalement strictement régulée et contrebalancée par des "antioxydants". Des conditions particulières peuvent conduire à un déséquilibre en faveur des espèces oxydantes, dépassant la capacité de défense "antioxydante" de la cellule. Ce déséquilibre peut perturber la transduction du signal et conduire jusqu'à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. Ces conditions sont rencontrées par exemple, lors des phénomènes d'anoxie-réoxygénation

ou lors de pathologies dégénératives chroniques. Les phagocytes, et surtout les neutrophiles, sont des cellules à haute capacité de production de RNOS ; elles peuvent être activées de manière incontrôlée dans les pathologies inflammatoires aiguës et systémiques, conduisant à une production de RNOS excessive, seule condition où l'on puisse réellement parler d'une "agression oxydante".

SUMMARY

Reactivity and chemical properties of oxygen

Given the enthusiasm arisen by reactive oxygen species among pathologists and clinicians, this synthesis reminds the chemical nature and the reactivity of oxygen. Generation of reactive nitrogen and oxygen species, their production in vivo and their physiological and toxic effects are explained emphasizing a recent aspect: their role in cell signaling and apoptosis.

BIBLIOGRAPHIE

- BABIOR B.M. NADPH oxidase : an update. *Blood*, 1999, **93**, 1464-1476.
- BABIOR B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 33-44.
- BAICHWAL V.R., BAUERLE P.A. Activate NF- κ B or die? *Curr. Biol.*, 1997, **7**, R94-R96.
- BECKMAN J.S., BECKMAN T.W., CHEN J., MARSHALL P.A., FREEMAN B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1990, **87**, 1620-1624.
- BECKMAN J.S., CHEN J., ISCHIROPOULOS H., CROW J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.*, 1994, **233**, 229-240.
- BECKMAN J.S., KOPPENOL W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite : the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, **271**, C1424-C1437.
- BECKMAN J.S. Oxidative damage and tyrosine nitrations from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **19**, 836-844.
- BENBAREK H., GRULKE S., DEBY-DUPONT G., DEBY C., MATHY-HARTERT M., CAUDRON I., DESSY-DOIZE C., LAMY M., SERTEYN D. Cytotoxicity of stimulated equine neutrophils on equine endothelial cells in culture. *Equine Vet. J.*, 2000, **4**, 327-333.
- BOSCA L., HORTELANO S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis : involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal*, 1999, **11**, 239-244.
- BOVERIS A., CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 1973, **134**, 707-716.
- BOWIE A., O'NEILL L.A.J. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **59**, 13-23.
- BRENNAN P., O'NEILL L.A. 2-Mercaptoethanol restores the ability of nuclear factor κ B (NF- κ B) to bind DNA in nuclear extracts from interleukin 1-treated cells incubated with pyroldine dithiocarbamate (PDTC). Evidence for oxidation of glutathione in the mechanism of inhibition of NF- κ B by PDTC. *Biochem. J.*, 1996, **320**, 975-981.
- CAI J., JONES D.P. Superoxide in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 11401-11404.
- CADENAS E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, **58**, 79-110.
- CARRERAS M.C., PARGAMENT G.A., CATZ S.D., PODEROSO J.J., BOVERIS A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 65-68.
- CHANCE B., WILLIAMS G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1955, **217**, 383-393.
- CHANCE B., SIES H., BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979, **59**, 527-605.
- CHANDEL N.S., SCHUMACKER P.T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insights. *J. Appl. Physiol.*, 2000, **88**, 1880-1889.
- CHANDRA J., SAMALI A., ORRENIUS S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **27**, 323-333.
- CLERCH L.B., MASSARO D. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J. Clin. Invest.*, 1993, **91**, 499-508.
- DEBY C., GOUTIER R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **38**, 399-405.
- DEBY C., GOUTIER R., DEBY-DUPONT G. Rôle des radicaux libres dans le vieillissement et thérapeutique antioxygène. *Ann. Cardiol. Angéiol.*, 1991, **40**, 341-348.
- DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Espèces oxygénées activées et radicaux libres. In : Carlet J., Martin C., Offenstadt G., Eds., *États infectieux graves - Perspectives thérapeutiques*. Masson : Paris, 1995, 130-148.
- DEBY C., HARTSTEIN G., DEBY-DUPONT G., LAMY M. Antioxidant therapy. In : Bion J.F. (ed), *Current topics in intensive care 2*. W.D. Saunders Company Ltd : London, 1995, 175-205.
- DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Neutrophil myeloperoxidase revisited: its role in health and disease. *Intensivmed.*, 1999a, **36**, 500-513.
- DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Oxygen therapy in intensive care patients : a vital poison? In: Vincent J.L. (ed), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer Verlag : Berlin, 1999b, 417-432.
- DEBY-DUPONT G., DEBY C., LAMY M. Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 2002, **11**, 28-39.
- DELATORRE A., SCHROEDER A., KUO P.C. Alteration of NF- κ B p50 DNA binding kinetics by S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997, **238**, 703-706.
- DENEKE S.M., FANBURG B.L. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N. Engl. J. Med.*, 1980, **303**, 76-86.
- DI MASCIO P., BRIVIBA K., BECHARA E.J., MEDEIROS M.H., SIES H. Reaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen ($^1\Delta$ g). *Methods Enzymol.*, 1996, **269**, 395-400.
- EL-HAG A., CLARK R.A. Immunosuppression by activated human neutrophils. *J. Immunol.*, 1987, **139**, 2406-2413.
- FANG F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, 1997, **100**, S43-S50.

- FIALKOW L., DOWNEY G.P. Reactive oxygen intermediates as signaling molecules regulating leukocyte activation. In : Forman H.J. and Cadenas E. (eds), Oxidative stress and signal transduction. Chapman & Hall : New York, 1997, 200-235.
- FORMAN H.J., TORRES M. Redox signaling in macrophages. *Mol. Aspects Med.*, 2001, **22**, 189-216.
- FRIDOVICH I. Superoxide dismutase. In : Hayashin O. (ed), Molecular mechanisms of oxygen activation. Academic Press : New York, 1974, 453-477.
- FRIDOVICH I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978, **201**, 875-880
- GHAFOURIFAR P., RICHTER C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.*, 1997, **418**, 291-296.
- GO Y.M., PATEL R.P., MALAND M.C., PARK H., BECKMAN J.S., DARLEY-USMAR V.M., HANJOONG J. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Am. J. Physiol.*, 1999, **277**, H1647-H1653.
- GOLDSTEIN S., CZAPSKI G., LIND J., MERÉNYI G. Tyrosine nitration by simultaneous generation of $\cdot\text{NO}$ and O_2^- under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 3031-3036.
- GOODE H.F., WEBSTER N.R. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1993, **21**, 1770-1776.
- GRIENDLING K.K., SORESCU D., USHIO-FUKAI M. NAD(P)H Oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000, **86**, 494-501.
- GRISHAM M.B., JOURD'HEUIL D., WINK D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites : implications in inflammation. *Am. J. Physiol.*, 1999, **276**, G315-G321.
- HADDAD J.J.E., OLVER R.E., LAND S.C. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 21130-21139.
- HAMILTON G.A. Chemical models and mechanisms for oxygenases In : Hayashi O. (ed), Molecular mechanisms of oxygen activation. Academic Press : New York, 1974, 405-451.
- HANCOCK J.T., JONES O.T. The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem. J.*, 1987, **242**, 103-107.
- HANCOCK J.T., DESIKAN R., NEILL S.J. Does the redox status of cytochrome c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **31**, 697-703.
- HAZEN S.L., HEINECKE J.W. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed chlorination is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**, 2075-2081.
- HENSLEY K., ROBINSON K.A., GABBITA S.P., SALS-MAN S., FLOYD R.A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **28**, 1456-1462.
- HERRLICH P., BOHMER F.D. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **59**, 35-41.
- HOCKENBERY D.M., OLTVAI Z.N., YIN X.M., MILLIMAN C.L., KORSMEYER S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, **75**, 241-251.
- HOLLAND J.A., O'DONNELL R.W., CHANG M.M., JOHNSON D.K., ZIEGLER L.M. Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium*, 2000, **7**, 109-119.
- IRANI K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ. Res.*, 2000, **87**, 179-183.
- ISCHIROPOULOS H. Biological tyrosine nitration : a physiopathological function of nitric oxide and reactive oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998a, **356**, 1-11.
- ISCHIROPOULOS H. Living and dying with reactive oxygen species. Focus on "peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease". *Am. J. Physiol.*, 1998b, **274**, C853-C854.
- JASPERS I., ZHANG W., FRASER A., SAMET J.M., REED W. Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaB α breakdown in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2001, **24**, 767-777.
- JEWELL U., KVIETIKOVA I., SCHEID A., BAUER C., WENGER R.H., GASSMANN M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.*, 2001, **15**, 1312-1314.
- JOURD'HEUIL D., JOURD'HEUIL F.L., KUTCHUKIAN P.S., MUSAH R.A. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 28799-28805.
- KAGAN V.E., FABISIAK J.P., SHVEDOVA A.A., TYURINA Y.Y., TYURIN V.A., KAWAI K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett.*, 2000, **477**, 1-7.
- KAMATA H., HIRATA H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*, 1999, **11**, 1-14.
- KANE D.J., SARAFIAN R., ANTON H., HAHN H., GRALLA E.B., VALENTINE J.S., ORD T., BREDESEN D.E., BUTLER. Bcl-2 inhibition of neural death : decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 1993, **262**, 1274-1277.
- KASHA M., BRABHAM D. Singlet oxygen electronic structure and photosensitization. In : Wasserman H.H., Murray R. (eds), Singlet oxygen. Academic Press : New York, 1979, 1-33.
- KAZZAZ J.A., XU J., PALLAIA T.A., MANTELL L., FEIN A.M., HOROWITZ S. Cellular oxygen toxicity. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 15182-15186.
- KHAN A.U. Quantitative generation of singlet ($^1\Delta_g$) oxygen from acidified aqueous peroxynitrite produced by the reaction of nitric oxide and superoxide anion. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1995, **10**, 329-33.

- KHAN A.U., KOVACIC D., KOLBANOVKIY A., DESAI M., FRENKEL K., GEACINTOV N.E. The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO⁻) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2000, **97**, 2984-2989.
- KISSNER R., NAUSER T., BUGNON P., LYE P.G., KOPPENOL W.H. Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high pressure stopped flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1285-1292.
- KOPPENOL W.H. Chemistry of peroxyxynitrite and its relevance to biological systems. *Met. Ions Biol. Syst.*, 1999, **36**, 597-619.
- KOPPENOL W.H. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep.*, 2001, **6**, 229-234.
- KYRIAKIS J.M., AVRUCH J. Sounding the alarm : protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 24313-24316.
- LAMB N.J., QUILAN G.J., WESERMAN S.T., GUTTERIDGE J.M.C., EVANS T.W. Nitration of proteins in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute respiratory distress syndrome receiving inhaled nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 1031-1034.
- LAMY M., NYS M., DEBY-DUPONT G. Reactive nitrogen and oxygen species : role and evidence of their production in humans. In : Vincent J.L. (ed), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer-Verlag : Berlin, 2001, 284-301.
- LEBEL C.P., ISCHIROPOULOS H., BONDY S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 1992, **5**, 227-231.
- LEE S.R., KWON K.S., KIM S.R., RHEE S.G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 stimulated with epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 15366-15372.
- LEE Y.J., SHACTER E. Hydrogen peroxide inhibits activation, not activity, of cellular caspases-3 in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **29**, 684-692.
- LELLI J.L. JR, BECKS L.L., DABROWSKA M.I., HINSHAW D.B. ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells . *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **25**, 694-702.
- LEGRAND-POELS S., BOURS V., PIRET B., PFLAUM M., EPE B., RENTIER B., PIETTE J. Transcription factor NF-kappaB is activated by photosensitization generating oxidative DNA damages. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 6925-6934.
- LEONARDUZZI G., ARKAN M.C., BASAGA H., CHIARPOTTO E., SEVANI A., POLI G. Lipid oxidation products in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **28**, 1370-1378.
- LIN K.T., XUE J.Y., SPOKAS E.G., SUN F.F., WONG P.Y.K. Peroxyxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3-family protease. *Am. J. Physiol.*, 1998, **274**, C855-C860.
- LOCKSHIN R.A., OSBORNE B., ZAKERI Z. Cell death in the third millenium. Editorial. *Cell Death Differ.*, 2000, **7**, 2-7.
- LOPEZ-BARNEO J., PARDAL R., ORTEGA-SAENZ P. Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.*, 2001, **63**, 259-287.
- MACMILLAN-CROW L.A., CROW J.P., THOMPSON J.A. Peroxyxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, 1998, **37**, 1613-1622.
- MACNEE W. Oxidative stress and lung inflammation in airway disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, **429**, 195-207.
- MANNICK J.B., HAUSLADEN A., LIU L., HESS D.T., ZENG M., MIAO Q.X., KANE L.S., GOW A.J., STAMLER J.S. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science*, 1999, **284**, 651-654.
- MARSHALL H.E., MERCHANT K., STAMLER J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *F.A.S.E.B. J.*, 2000, **14**, 1889-1900.
- MATHY-HARTERT M., DAMAS P., NYS M., DEBY-DUPONT G., CANNIVET J.L., LEDOUX D., LAMY M. Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia. *Eur. Respir. J.*, 2000, **16**, 296-301.
- MATUTE-BELLO G., LILES W.C., RADELLA F., STEINBERG K.P., RUZINSKI J.T., JONAS M., CHI E.Y., HUDSON L.D., MARTIN T.R. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, **156**, 1969-1977.
- MCCORD J.M. Oxygen-derived radicals : a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.*, 1987, **46**, 2402-2406.
- MCCORD J.M., FRIDOVICH I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 5753-5760.
- MEYER J.M., HOLLAND J.A., ZIEGLER L.M., CHANG M.M., BEEBE G., SCHMITT M.E. Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells : a potential atherogenic source of reactive oxygen species. *Endothelium*, 1999, **7**, 11-22.
- MOUITHYS-MICKALAD A., KOHNEN S., DEBY C., NOELS A.F., LAMY M., DEBY-DUPONT G. Peroxyxynitrite reacts with biological nitrogen-containing cyclic molecules by a radical pathway, as demonstrated by ultraweak luminescence coupled with ESR technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, **259**, 460-464.
- MUSTACHICH D., POWIS G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 2000, **346**, 1-8.
- MUSTAFA M.G. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 1990, **9**, 245-265.
- NOMURA K., IMAI H., KOUMURA T., KOBAYASHI T., NAKAGAWA Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipid in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.*, 2000, **351**, 183-193.

- O'DONNELL V.B., EISERICH J.P., BLOODSWORTH A., CHUMLEY P.H., KIRK M., BARNES S., DARLEY-USMAR V.M., FREEMAN B.A. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species. *Methods Enzymol.*, 1999, **301**, 454-470.
- PANI G., COLAVITTI R., BORRELLO S., GALEOTTI T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem. J.*, 2000, **347**, 173-181.
- PFEIFFER S., LASS A., SCHMIDT K., MAYER B. Protein tyrosine nitration in mouse peritoneal macrophages activated in vitro and in vivo : evidence against an essential role of peroxynitrite. *FASEB J.*, 2001, **15**, 2355-2364.
- PINKUS R., WEINER L.M., DANIEL V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 13422-13429.
- PRUTZ W.A., KISSNER R., NAUSER T., KOPPENOL W.H. On the oxidation of cytochrome c by hypohalous acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **389**, 110-122.
- PRYOR W.A., PRIER D.G., CHURCH D.F. Radical production from the interaction of ozone and PUFA as demonstrated by electron spin resonance spin-trapping techniques. *Environ. Res.*, 1981, **24**, 42-52.
- PRYOR W.A., SQUADRITO G.L. The chemistry of peroxynitrite : a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.*, 1995, **268**, L699-L722.
- QUIJANO C., ALVAREZ B., GATTI R.M., AUGUSTO O., RADI R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.*, 1997, **322**, 167-173.
- QUINLAN G.J., CHEN Y., EVANS T.W., GUTTERIDGE J.M.C. Iron signalling regulated directly and through oxygen: implications for sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Clin. Science*, 2001, **100**, 169-182.
- RADI R., DENICOLA A., FREEMAN B.A. Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methods Enzymol.*, 1999, **301**, 353-367.
- RADI R., PELUFFO G., ALVAREZ M.N., NAVILIAT M., CAYOTA A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463-488.
- RAHMAN I., MULIER B., GILMOUR P.S., WATCHORN T., DONALDSON K., JEFFERY P.K., MACNEE W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance : the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. *Biochem. Pharmacol.*, 2001, **62**, 787-794.
- RAMEZANIAN M.S., PADMAJA S., KOPPENOL W.H. Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996, **9**, 232-240.
- REN R.G., XIA H.L., JUST T., DAI Y.R. Hydroxyl radical-induced apoptosis in human tumor cells is associated with telomere shortening but not telomerase inhibition and caspase activation. *FEBS Lett.*, 2001, **488**, 123-132.
- RICHTER C., SCHWEIZER M., COSSARIZZA A., FRANCHESCHI C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. Hypothesis. *FEBS Lett.*, 1996, **378**, 107-110.
- RYTER S.W., TYRRELL R.M. Singlet molecular oxygen (1O_2) : a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998, **24**, 1520-1534.
- SAHAN T.A., SORENSON W.G., SIMPSON J., KEFALIDES N.A., LEWIS D.M. Tyrosine kinase activation in response to fungal spores is primarily dependent on endogenous reactive oxygen production in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 10175-10181.
- SAMPSON J.B., YE Y., ROSEN H., BECKMAN J.S. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 1998, **356**, 207-213.
- SANDERS S.P., ZWEIER J.L., KUPPUSAMY P., HARRISON J., BASSETT D.J., GABRIELSON E.W. *et al.* Hyperoxic sheep pulmonary microvascular endothelial cells generate free radicals via mitochondrial electron transport. *J. Clin. Invest.*, 1993, **91**, 146-152.
- SAVILL J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br. Med. J.*, 1997, **53**, 491-508.
- SAWYER D.T. Reactivity of superoxide anion. In: *Oxygen Chemistry*. Oxford University Press: New-York, 1991, 223 p
- SAWYER D.T., GIBIAN M.J. The chemistry of superoxide ion. *Tetrahedron*, 1979, **35**, 1471-1481.
- SCHOONBROODT S., LEGRAND-POELS S., BEST-BELPOMME M., PIETTE J. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **321**, 777-785.
- SCHOONBROODT S., FERREIRA V., BEST-BELPOMME M., BOELAERT J.R., LEGRAND-POELS S., KORNER M., PIETTE J. Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B activation by an oxidative stress. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 4292-4300.
- SCHRECK R., BAEUERLE P.A. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell. Biol.*, 1991, **1**, 2-3.
- SCHWARTZ M.D., MOORE E.E., MOORE F.A., SHENKAR R., MOINE P., HAENEL J.B., ABRAHAM E. Nuclear factor- κ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.*, 1996, **24**, 1285-1292.
- SEN C.K., PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, 1996, **10**, 709-720.
- SERTEYN D., MOTTART E., DEBY C., DEBY-DUPONT G., PINCEMAIL J., PHILIPART C., LAMY M. Equine postanaesthetic myositis: a possible role for free radical generation and membrane lipoperoxidation. *Res. Vet. Sci.*, 1990, **48**, 42-46.
- SIES H., ARTEEL G.E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **28**, 1451-1455.

- SITTIPUNT C., STEINBERG K.P., RUZINSKI J.T., MYLES C., ZHU S., GOODMAN R.B., HUDSON L.D., MATALON S., MARTIN T.R. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, **163**, 503-510.
- SLATER A.F.G., NOBEL C.S.I., ORRENIUS S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochem. Pharmacol. Acta*, 1995, **1271**, 59-62.
- STORZ G., TARTAGLIA L.A., AMES B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes : direct activation by oxidation. *Science*, 1990, **248**, 189-194.
- STUBBE J. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J. Biol. Chem.*, 1990, **265** (10), 5329-32.
- SUNDARESAN M., YU Z.X., FERRANS V.J., IRANI K., FINKEL T. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 1995, **270**, 296-299.
- SUZUKI Y.J., FORMAN H.J., SEVANI A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, **22**, 269-285.
- THANNICKAL V.J., FANBURG B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, **279**, L1005-L1028.
- THOM S.R., XU Y.A., ISCHIROPOULOS H. Vascular endothelial cells generate peroxynitrite in response to carbon monoxide exposure. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 1023-1031.
- TRUE A.L., RAHMAN A., MALIK A.B. Activation of NF- κ B induced by H₂O₂ and TNF- α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, **279**, L302-L311.
- TURRENS J.F., ALEXANDRE A., LEHNINGER A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, **237**, 408-414.
- VAN DER VLIET A., EISERICH J.P., SHIGENAGA M.K., CROSS C.E. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, 1-9.
- VAN DER VLIET A., CROSS C.E. Oxidants, nitrosants and the lung. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 398-421.
- VASQUEZ-VIVAR J., KALYANARAMAN B., MARTASEK P., HOGG N., MASTERS B.S.S., KAROUI H., TORDO P., PRITCHARD JR K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 9220-9225.
- WATERS W.A. The chemistry of free radicals. Clarendon Press : Oxford, 1948, 233 p.
- WINTERBOURN C.C., BRENNAN S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **326**, 87-92.
- ZULUETA J.J., YU F.S., HERTIG I.A., THANNICKAL V.J., HASSOUN P.M. Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation : role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1995, **12**, 41-49.
- ZULUETA J.J., SAWHNEY R., KAYYALI U., FOGEL M., DONALDSON C., HUANG H., LANZILLO J.J., HASSOUN P.M. Modulation of inducible nitric oxide synthase by hypoxia in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2002, **26**, 22-30.

1. DÉNOMINATION - EXCENEL® RTU

2. COMPOSITION qualitative et quantitative en principes actifs, enconstituants de l'excipient dont la connaissance est nécessaire à une bonne administration du médicament.

Ceftiofur: 50 mg (sous forme de chlorhydrate) huile de graine de coton qs 1 ml

3. FORME PHARMACEUTIQUE

Suspension injectable.

4. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

Le ceftiofur est une céphalosporine résistante aux b-lactamases dont le spectre d'activité couvre les bactéries gram positif et gram négatif. Le ceftiofur agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, ce qui est à l'origine de ses propriétés bactéricides.

Le ceftiofur est actif sur les germes suivants : Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae et Streptococcus suis, qui sont impliqués dans les affections respiratoires du porc.

Bordetella bronchiseptica est naturellement résistante au ceftiofur.

Il est également actif sur les germes responsables des affections respiratoires des bovins : Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica (Mannheimia spp.), Haemophilus somnus, et les germes responsables du panaris interdigité des bovins : Fusobacterium necrophorum, Bacteroides melaninogenicus.

Après administration intramusculaire, le ceftiofur est rapidement métabolisé en desfuroylceftiofur, le métabolite actif principal. L'activité antimicrobienne du desfuroylceftiofur sur les germes responsables des maladies respiratoires animales est identique à celle du ceftiofur. La concentration plasmatique maximale en desfuroylceftiofur est atteinte en une heure chez les porcins et 3 heures chez les bovins.

La demi-vie du métabolite majeur (t 1/2) est de 16.7 + 2.3 heures chez le porc.

Il n'a pas été observé d'accumulation de desfuroylceftiofur après l'administration quotidienne de 3 mg ceftiofur/kg P.V./j. pendant trois jours.

L'élimination se fait principalement par voie urinaire (plus de 70%).

Environ 12 à 15% du médicament se retrouve, en moyenne, dans les faeces.

La biodisponibilité du ceftiofur après administration intramusculaire est totale.

Chez les bovins, la demi-vie d'élimination du desfuroylceftiofur est de 11 heures. Aucune accumulation n'a été observée lors d'un traitement de 5 jours. La voie d'élimination principale est urinaire (supérieure à 55%). 31 % de la dose initiale sont retrouvés dans les féces.

La biodisponibilité du ceftiofur, après injection sous-cutanée, est totale.

5. INFORMATIONS CLINIQUES

5.0 Espèces-cibles

Porcins et bovins.

5.1 Indications d'utilisation, en spécifiant les espèces-cibles;

Affections à germes sensibles au ceftiofur :

Porcins: Traitement curatif des infections respiratoires à Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae et Streptococcus suis.

Bovins: Traitement curatif des infections respiratoires à Pasteurella haemolytica (Mannheimia spp.), Pasteurella multocida et Haemophilus somnus.

Traitement curatif du panaris interdigité à Fusobacterium necrophorum et Bacteroides melaninogenicus.

5.2 Contre-indications

Ne pas administrer aux animaux ayant des antécédents d'hypersensibilité au ceftiofur ou aux autres b-lactam antibiotiques.

5.3 Effets indésirables (fréquence et gravité)

Chez les porcins, au point d'injection, des réactions peu sévères telle qu'une décoloration du fascia ou de la graisse sont observées chez certains animaux jusqu'à 20 jours après l'injection.

Les bovins peuvent présenter à l'endroit de l'injection de légères réactions inflammatoires telles qu'oedème tissulaire et décoloration du tissu sous-cutané et/ou du fascia musculaire.

Chez la plupart des animaux, le site d'injection est cliniquement normal après 10 jours, même si une légère décoloration tissulaire peut persister 28 jours ou plus.

5.4 Précautions particulières d'emploi

Secouer énergiquement le flacon avant utilisation, pour permettre la remise en suspension du produit.

5.5 Utilisation en cas de gravidité et de lactation

Bien que l'on n'ait trouvé aucune preuve d'effet tératogène, d'avortement ou d'effet sur la reproduction dans les études menées sur des animaux de laboratoire, la sécurité du ceftiofur en matière de reproduction n'a pas été spécifiquement démontrée chez les truies ou les vaches gravides.

5.6 Interactions médicamenteuses et autres

Non connues.

5.7 Posologie et mode d'administration

Porcins: 3 mg de ceftiofur par kg de poids vif par jour pendant 3 jours, par voie intramusculaire, soit 1 ml/16 kg à chaque injection.

Bovins: Traitement des affections respiratoires : 1 mg de ceftiofur par kg de poids vif par jour pendant 3 à 5 jours, par voie sous-cutanée, soit 1 ml/50 kg à chaque injection.

Traitement du panaris interdigité: 1 mg de ceftiofur par kg de poids vif par jour pendant 3 jours, par voie sous-cutanée, soit 1 ml/50 kg à chaque injection. Les injections suivantes doivent être faites en différents points.

5.8 Surdosage (symptômes, conduite d'urgence, antidotes) (le cas échéant)

La sécurité du ceftiofur a été démontrée chez le porc par l'utilisation de doses 10 fois supérieures à la posologie quotidienne recommandée, administrées pendant 15 jours consécutifs par voie intramusculaire.

Chez les bovins, aucun signe de toxicité systémique n'a été observé lors de surdosage important par administration parentérale.

5.9 Mise en garde particulière à chaque espèce-cible

Aucune.

5.10 Temps d'attente

Porcins: Viande et abats: 5 jours

Bovins: Viande et abats: 8 jours

Lait: zéro jour

5.11 Précautions particulières à prendre par la personne qui administre le produit aux animaux

Les pénicillines et les céphalosporines peuvent provoquer une hypersensibilité (allergie) à la suite de leur injection, inhalation, ingestion, ou au contact de la peau. L'hypersensibilités aux céphalosporines et aux pénicillines peut être croisée. Les réactions allergiques à ces substances peuvent être graves.

En cas d'hypersensibilité, éviter tout contact avec le produit. En cas d'apparition d'érythème cutané, prendre l'avis d'un médecin. En cas d'apparition d'oedème du visage, des lèvres, des yeux ou en cas d'apparition d'une difficulté respiratoire, consulter immédiatement un médecin.

6. INFORMATIONS PHARMACEUTIQUES

6.1 Incompatibilités (majeures)

Non connues.

6.2 Durée limite d'utilisation, si nécessaire après reconstitution du produit ou lorsque le récipient est ouvert pour la première fois;

24 moisAprès première utilisation: 30 jours à une température inférieure à 25°C.

6.3 Précautions particulières de conservation

Conserver à une température inférieure à 25°C.

6.4 Nature et contenu du récipient. Numéros d'identification administrative

Nature du conditionnement primaire

Flacon verre de type I avec bouchon de caoutchouc.

Modèle(s) destiné(s) à la vente et numéro(s) d'identification administrative

Boîte de 1 flacon de 100 ml

Boîte de 10 flacons de 100 ml

6.5 Nom ou raison sociale et domicile ou siège social du titulaire de l'autorisation de mise sur le marché

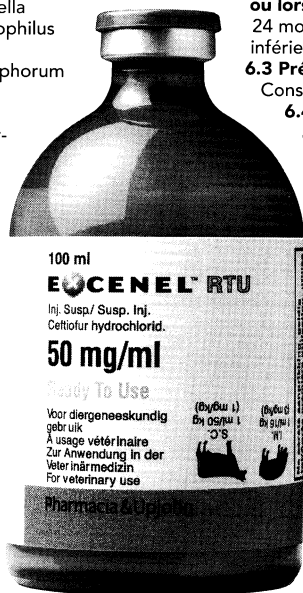
Pharmacia NV/SA, Rijksweg 12, 2870 Puurs, Belgique

6.6 Précautions particulières à prendre lors de l'élimination de produits non utilisés ou de déchets, le cas échéant.

Tous médicaments vétérinaires non utilisés ou déchets dérivés de ces médicaments doivent être éliminés conformément aux exigences locales.

277IS275F12 14F00

Copyright Pharmacia



EXCENEL™ RTU

Suspension Stérile

AGIT SUR LA VACHE - PAS SUR LE LAIT

Pharmacia SA - Rijksweg 12 - 2870 Puurs - tél.: 03 8909211 - fax: 03 8909504

www.pharmaciaAH.be

PHARMACIA Animal Health