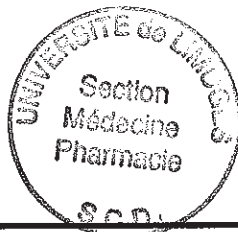


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1995



THESE N° 213

**MODULATION DE L'ACTIVITE ANTIRADICALAIRE D'UN
INHIBITEUR DE
L'ENZYME DE CONVERSION, LE CAPTOPRIL, PAR ALKYLATION
D'UN GROUPEMENT THIOL (SH)
EVALUATION PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE
ELECTRONIQUE**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 12 AVRIL 1995

par

Hicham AMARTI

né le 10 Aout 1965 à Rabat (MAROC)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur LAGORCE J.F. Maître de conférences.....- PRESIDENT
Monsieur DUROUX J.L. Maître de conférences.....- JUGE
Monsieur FATIMI J. A.T.E.R.....- JUGE
Madame LAMARSALLE A. Pharmacien.....- JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES**FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur RABY Claude

ASSESEURS:Monsieur le Professeur GHESTEM Axel
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de conférences**PROFESSEURS:**

BENEYTOUT jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
MOESH Christian	HYGIENE
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICE ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A notre Président de thèse

Monsieur Jean-François LAGORCE,
Maître de conférences de Chimie Organique et de Chimie Thérapeutique,
Docteur d'état en Pharmacie,
Diplômé d'études approfondies de Pharmacochimie,
Diplômé du Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques.

Monsieur, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce Jury de soutenance.

Par la qualité de votre enseignement, votre sympathie et la motivation que vous avez su créer chez nous, vous nous aurez guidés dans l'orientation de nos études.

Nous vous remercions de nous avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour réaliser ce travail.

Soyez assuré, Monsieur, de notre respectueuse gratitude.

Monsieur Jean Luc DUROUX,
Maître de conférences de Biophysique à la Faculté de Pharmacie de Limoges,

**Monsieur, nous vous remercions d'avoir accepté de juger
ce travail.**

**Par la qualité de vos conseils, votre aide précieuse et votre
disponibilité, vous aurez facilité ce travail.**

**Veillez trouver ici le témoignage de notre profonde
gratitude.**

**Monsieur Jamal FATIMI,
A.T.E.R. de Chimie Organique à la Faculté de Pharmacie de Limoges,**

**Monsieur, vous nous faites l'honneur de siéger dans ce
Jury de soutenance.**

**Pour votre disponibilité, vos conseils, votre aide et votre
patience dans la réalisation de ce travail, nous vous
remercions encore.**

**Madame Marie-Annick LAMARSALLE,
Docteur en Pharmacie,**

**Madame, nous vous remercions d'avoir accepté de siéger
dans ce Jury de soutenance.**

**Nous avons été sensibles à votre disponibilité et à vos
conseils dans la rédaction de ce travail.**

A tous les membres du laboratoire,

**Monsieur le professeur RABY,
Monsieur le professeur BUXERAUD,
Madame Marie-Laure CHABERNAUD,
Madame Frédérique CLAUDE,
Mademoiselle Frédérique MARTIN,
Mesdames BOUILLAGUET et CARDE.**

**Pour leur accueil, leur sympathie, leur efficacité et leurs
compétences.**

A ma mère,
A mon père,
A ma soeur,
A mon frère,
A ma femme,
A toute ma famille,
A tous mes amis,

qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de
mes études.

Recevez, par l'intermédiaire de ce travail que je vous dédie,
mes sincères et chaleureux remerciements.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

CAPTOPRIL : GENERALITES ET BUTS DE LA MANIPULATION

I/ INTRODUCTION : GENERALITES SUR LE CAPTOPRIL

I-1 D.C.I.

I-2 Nom scientifique

I-3 Formule développée

I-4 Masse moléculaire

I-5 Structure

I-6 Caractéristiques physico-chimiques

I-6-1 Caractères

I-6-2 Solubilité

I-6-3 Pouvoir rotatoire spécifique

I-6-4 Spectre I.R.

I-6-5 Spectre R.M.N.

I-6-6 Spectre de masse

I-6-7 Identification

I-6-8 Dosage

I-7 Classification

I-8 Molécule chimique la plus voisine

I-9 Référence de classement

I-10 Commercialisation

I-11 Appartenance au tableau des substances vénéneuses

I-12 Synthèse

II/ MECANISME D'ACTION DU CAPTOPRIL

II-1 Physiologie du système rénine - angiotensine - aldostérone

II-2 Points d'impacts des antihypertenseurs sur le système rénine angiotensine

II-3 Structure et mécanisme d'action du captopril

II-3-1 Au niveau physiologique

II-3-2 Interactions structure - récepteurs

II-3-3 Relation structure - activité

III/ PHARMACOLOGIE

III-1 Propriétés hémodynamiques

III-1-1 Hypertension artérielle

III-1-1-1 Au niveau de l'enzyme de conversion

III-1-1-2 Chez l'hypertendu

III-1-1-3 Au niveau des gros troncs artériels

III-1-1-4 Au niveau du débit rénal et cérébral

III-1-2 Insuffisance cardiaque

III-1-2-1 Mécanismes simplifiés de l'insuffisance cardiaque

III-2 Pharmacocinétique

III-2-1 Chez le sujet sain

III-2-2 Chez les sujets hypertendus

III-2-3 Chez les insuffisants rénaux

III-2-4 Chez les patients dialysés

III-2-5 Concentration de captopril dans le lait des femmes allaitantes

III-3 Effets sur l'équilibre hydro - électrolytique

III-4 Autres effets

IV/ MODALITES THERAPEUTIQUES

IV-1 L'hypertension artérielle

IV-2 Choix du traitement

IV-3 Intérêts thérapeutiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion

IV-4 Captopril

IV-4-1 Indications

IV-4-2 Mode d'emploi et posologie

IV-4-2-1 Hypertension artérielle

IV-4-2-2 Insuffisance cardiaque congestive

IV-4-2-3 Posologie

IV-4-3 Contre-indication

IV-4-4 Mise en garde

IV-4-5 Précautions d'emploi

IV-4-5-1 Traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque congestive

IV-4-5-2 Traitement de l'insuffisance cardiaque congestive

IV-4-5-3 Grossesse

IV-4-6 Interactions médicamenteuses

IV-4-7 Effets indésirables

IV-4-8 Surdosage

IV-4-9 Conditions d'une substitution à un autre antihypertenseur

V/ BUTS DE LA MANIPULATION

DEUXIEME PARTIE

LES RADICAUX LIBRES

I/ PRESENTATION DES RADICAUX LIBRES

I-1 DEFINITION

I-2 PROPRIETES DES RADICAUX LIBRES

I-2-1 Réactivité des radicaux libres

I-2-2 Energie des radicaux libres

I-2-3 Cinétique des radicaux libres

I-3 FORMATION DES RADICAUX LIBRES

I-3-1 Radicaux libres provenant de l'oxygène

I-3-1-1 Radicaux libres oxygénés

I-3-1-2 Oxygène de l'air

I-3-1-3 L'anion superoxyde

I-3-1-4 Le peroxyde d'hydrogène

I-3-1-5 Le radical hydroxyle

I-3-1-6 L'oxygène singulet

I-3-2 Sources physiologiques des radicaux libres

I-3-2-1 La chaîne respiratoire mitochondriale

I-3-2-2 La phagocytose

I-3-2-3 La synthèse des prostaglandines

I-3-2-4 Les réactions enzymatiques

I-3-2-5 Les réactions de détoxication

I-3-2-6 Les rayonnements

II / PHENOMENES TOXIQUES DES RADICAUX LIBRES

II-1 Phénomènes toxicologiques

II-2 Toxicité médicamenteuse

III / POUVOIR PATHOGENE DES RADICAUX LIBRES

III-1 Mécanisme de l'agression radicalaire

III-2 Cibles biologiques

III-2-1 Acides nucléiques

III-2-2 Protéines

III-2-3 Phospholipides membranaires

III-2-3-1 Structure de la membrane cellulaire

III-2-3-2 Destructuration membranaire

III-2-3-3 Conséquences de la peroxydation lipidique

III-3 Radicaux libres et pathologie cardio-vasculaire

III-3-1 Ischémie-reperfusion du myocarde

III-3-2 Autres points d'impacts des radicaux libres

III-3-2 -1 Nécrose myocardique

III-3-2 -2 Arythmies de reperfusion

III-3-2 -3 Athérosclérose

III-3-2 -4 Hyperagrégation plaquettaire

III-3-2 -5 Vasospasme cérébral

IV / SYSTEMES PHYSIOLOGIQUES DE DEFENSE FACE A LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES

IV-1 Systèmes de défense enzymatiques

IV-1-1 La superoxyde dismutase

IV-1-2 Les enzymes de destruction des peroxydes

IV-1-2-1 Les catalases

IV-1-2-2 La glutathion peroxydase

IV-2 Les piègeurs de radicaux libres

IV-2-1 L'alpha-tocophérol ou vitamine E

IV-2-2 L'acide L-ascorbique ou vitamine C

IV-2-3 Les caroténoïdes et la vitamine A

IV-2-4 Le glutathion

TROISIEME PARTIE

PARTIE EXPERIMENTALE

I/ METHODE D'ETUDE UTILISEE : LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

I-1 Définition

I-2 Principe

I-3 Appareillage

I-4 Méthodes d'analyse

I-4-1 Le « SPIN-TRAP »

I-4-1-1 Principe

I-4-1-2 Protocole expérimental

I-4-2 Le « SPIN-LABEL »

I-4-2-1 Principe

I-4-2-2 Protocole expérimental

II/ THIOALKYLATION PAR CATALYSE PAR TRANSFERT DE PHASE

II-1 Principe de la CTP

II-2 Mécanisme réactionnel

II-3 Equations théoriques

II-4 Cinétique

III/ RESULTATS

III-1 Méthylation du captopril

III-1-1 Conditions opératoires

III-1-2 Essais de solubilité

III-1-3 Points de fusion

III-1-4 Spectres U.V.-Visible

III-1-5 Spectres Infra-Rouge

III-1-6 Spectres RMN

III-2 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par RPE

III-2-1 Evaluation par « SPIN-LABEL »

III-2-2 Evaluation par « SPIN-TRAP »

IV/ DISCUSSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Le captopril est un inhibiteur de l'enzyme de conversion qui est utilisé comme antihypertenseur.

Il est le chef de file de sa classe thérapeutique et il possède la particularité d'être le seul à avoir une fonction thiol (SH) dans sa structure. Ceci est important car cette fonction thiol confère à d'autres molécules la possédant une activité antiradicalaire.

Les radicaux libres constituent à l'heure actuelle un des principaux thèmes de recherche en pathologie humaine, on connaît en effet depuis longtemps les effets cellulaires toxiques des radicaux libres, particulièrement des radicaux libres oxygénés.

Nous nous intéressons surtout aux radicaux libres oxygénés produit lors de la reperfusion brutale du tissu cardiaque, qui sont responsables de la nécrose de ce tissu lors d'un infarctus du myocarde.

Nous allons essayer de démontrer que le captopril, en plus de son effet sur la tension artérielle, joue un effet protecteur par sa fonction thiol contre les radicaux libres.

Pour vérifier que c'est bien cette fonction thiol qui est responsable de cet effet, nous allons la méthyler en faisant une catalyse par transfert de phase. Puis nous allons comparer l'effet antiradicalaire du captopril et du captopril méthylé.

L'effet antiradicalaire sera évalué par résonance paramagnétique électronique, méthode de détection qui permet de mettre en évidence les radicaux libres oxygénés.

Nous utiliserons deux méthodes différentes de détection, le spin-trap et le spin-label.

Enfin, nous comparerons l'effet antiradicalaire du captopril et du captopril méthylé sur sa fonction thiol par rapport à la référence de chaque méthode.

LE CAPTOPRIL

I/ INTRODUCTION : GENERALITES SUR LE CAPTOPRIL.

Le captopril est un médicament antihypertenseur, il fait partie de la famille des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC).

I-1 D.C.I. :

Captopril

I-2 Nom scientifique :

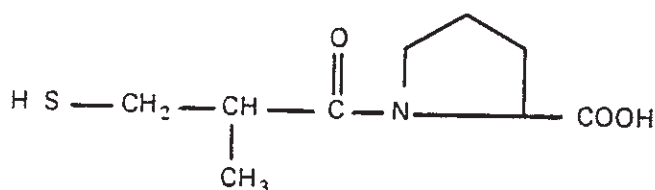
1-(D-3-Mercapto-2-Méthyl-1-oxopropyl)-L-proline (S,S)

ou

Acide-1-(3-mercapto-2-méthyl propionyl) pyrrolidine-2 carboxylique.

I-3 Formule développée :

$C_9 H_{15} N O_3 S$

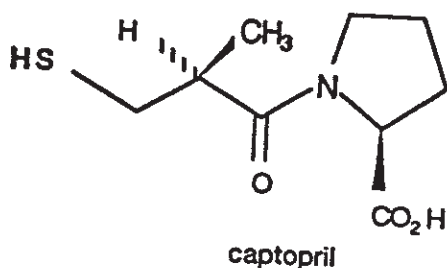


I-4 Masse moléculaire :

$M_r = 217.28$

I-5 Structure :

(1)



I-6 Caractéristiques physico-chimiques :

I-6-1 Caractères :

Le captopril se présente sous forme d'une poudre cristalline, blanche à sensiblement blanche, d'odeur soufrée.

I-6-2 Solubilité :

Le captopril est soluble dans le méthanol, l'éthanol et l'eau.

La solubilité dans l'eau est de 150 mg/ml.

Il est assez soluble dans le chloroforme et l'acétate d'éthyle.

Le coefficient de partage octanol/eau (tampon phosphate, pH 7) est de 1,7.

pKa = 3,7 / 9,8.

I-6-3 Pouvoir rotatoire spécifique :

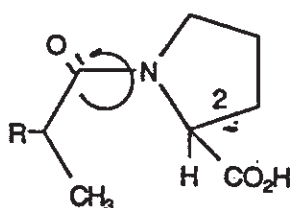
$[\alpha] = -128^\circ \pm 5^\circ$; Ce pouvoir rotatoire est déterminé en solution à raison de 1g de captopril pour 100 ml d'éthanol absolu.

I-6-4 Spectre I.R. :

Les absorptions les plus caractéristiques sont celles des carbonyles à 1640 cm⁻¹ pour les carboxamides.

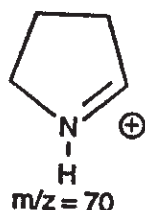
I-6-5 Spectre R.M.N. :

On observe un doublet à champ fort dû au méthyle, et un signal complexe vers 4,6 p.p.m. correspondant au C(2)-H de la proline. Les signaux faiblement intenses sont ceux du rotamère minoritaire (1).



I-6-6 Spectre de masse :

L'ion à $m/z = 70$ est présent sur le spectre, il correspond à la proline (1).

**I-6-7 Identification :**

Le captopril est identifié par son spectre d'absorption dans l'infra-rouge, ainsi que par son pouvoir rotatoire spécifique.

I-6-8 Dosage :

Généralement, le captopril est dosé par alcalimétrie grâce à la présence de l'acide carboxylique.

Le captopril peut aussi être dosé grâce à sa fonction thiol en utilisant son pouvoir réducteur (réaction colorée d' ELLMAN), ou par formation d'un dérivé S - nitroso (réaction de BRATTON-MARSALL).

Dans les milieux biologiques, le captopril est instable, et sa fonction thiol doit être protégée par dérivation : il peut alors y être détecté ou dosé par des méthodes spectrométriques classiques.

I-6-9 Point de fusion :

Le point de fusion du captopril est de 103-104° (Ondetti, Cushman).

Le captopril est considéré comme un polymorphe.

I-7 Classification :

Le captopril est un médicament antihypertenseur, c'est le chef de file des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) qui agissent au niveau du système rénine-angiotensine-aldostérone.

Cf. Tableau 1 : Classification générale des antihypertenseurs**I-8 Molécule chimique la plus voisine :**

Enalapril (DCI) ; Antihypertenseur, inhibiteur de l'enzyme de conversion.

I-9 Référence de classement :

- C 2 b - classement E.P.H.E.M.R.A.

I-10 Commercialisation :

Le captopril seul est commercialisé en FRANCE depuis 1982 sous le nom de LOPRIL® (Squibb) et depuis 1984 sous le nom de CAPTOLANE® (Théraplix) sous la forme de comprimés sécables dosés à 25 ou 50 mg.

En association avec l'hydrochlorothiazide (diurétique thiazidique) sous les noms de CAPTEA® (Théraplix, 1987) et ECAZIDE® (Squibb, 1988) sous la forme de comprimés sécables dosés à 50 mg de captopril et 25 mg d'hydrochlorothiazide.

I-11 Appartenance au tableau des substances vénéneuses :

Le captopril appartient à la LISTE I (ancien Tableau A).

I/ DIURETIQUES ET APPARENTES :

Ils potentialisent les effets de tous les autres antihypertenseurs.

Deux diurétiques sont exclusivement utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle :
Ciclétanine et Indapamide.

II/ BETA-BLOQUANTS :

Acébutolol ; Aténolol ; Bétaxolol ; Bisoprolol ; Carteolol ; Celiprolol ; Labétolol ; Lévo-penbutolol ; Métoprolol ; Nadolol ; Oxprénolol ; Pindolol ; Propranolol ; Sotalol ; Tertatolol ; Timolol.

III/ INHIBITEURS DE L'ENZYME DE CONVERSION (IEC) :

Bénazépril ; Captopril ; Cilazapril ; Enalapril ; Lisinopril ; Périndopril ; Quinapril ; Ramipril ; Trandolapril.

IV/ INHIBITEURS CALCIQUES :**IV-1/ Dihydropyridines :**

Amlodipine ; Félodipine ; Isradipine ; Lacidipine ; Nicardipine ; Nifédipine ; Nitrendipine.

IV-2/ Diltiazem.

IV-3/ Vérapamil.

V/ ANTIHYPERTENSEURS D'ACTION CENTRALE :

Clonidine et apparentés ; Méthyl-dopa ; Rilménidine.

VI/ ANTIHYPERTENSEURS VASODILATATEURS :

VI-1/ Alpha-bloquants : Prazosine ; Urapidil.

VI-2/ Diazoxide.

VI-3/ Dihydralazine.

VI-4/ Minoxidil.

VI-5/ Nitroprussiate de sodium.

VII/ ASSOCIATION DE PLUSIEURS ANTIHYPERTENSEURS :

VII-1/ Inhibiteurs de l'enzyme de conversion avec les diurétiques thiazidiques.

VII-2/ Béta-bloquants avec les diurétiques.

VII-3/ Béta-bloquants avec les inhibiteurs calciques.

VII-4/ Béta-bloquants avec les vasodilatateurs.

VII-5/ Diurétiques avec la réserpine.

VII-6/ Diurétiques avec la guanéthidine.

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION GENERALE DES ANTIHYPERTENSEURS (2).

I-12 Synthèse :

La synthèse du captopril est classique, l'une des plus simple est la synthèse de SHIMASAKI, la seule difficulté étant d'ordre stéréochimique.

Cette synthèse se déroule en quatre étapes (1),

- Première étape :

On introduit la chiralité par hydratation énantiosélective de l'acide α -méthyl acrylique, par des microorganismes.

- Deuxième étape :

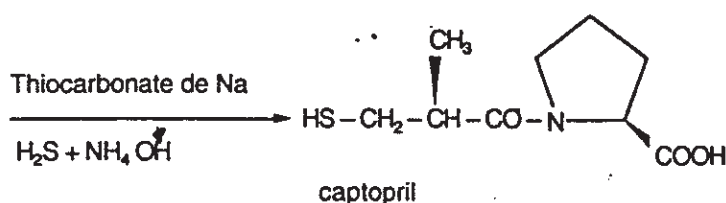
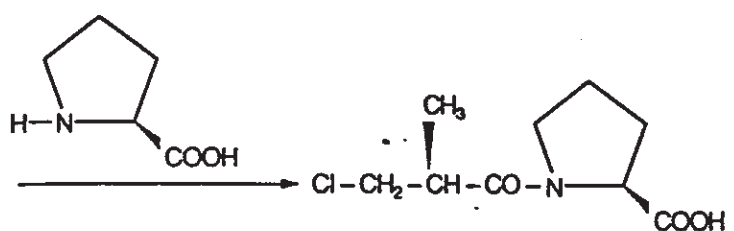
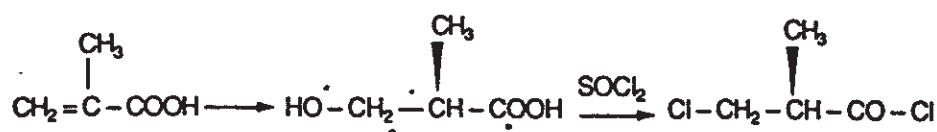
Les deux fonctions hydroxylées sont transformées en chlorure par action de SOCl_2 .

- Troisième étape :

Action de la fonction chlorure d'acide (la plus réactive) sur la L-proline.

- Quatrième étape :

Introduction du groupement thiol du captopril par une réaction de substitution.



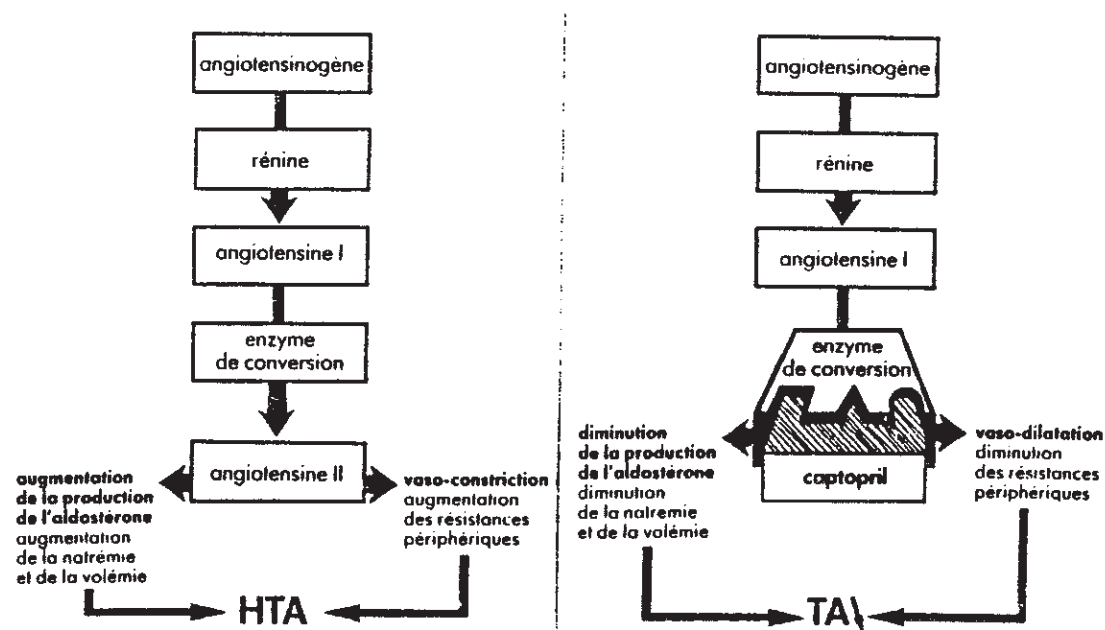
II/ MECANISME D'ACTION DU CAPTOPRIL :

Le captopril est le chef de file d'une classe de médicaments vasodilatateurs, efficace dans l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque congestive.

Son mécanisme d'action est original, c'est le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion actif par voie orale.

Il bloque le système rénine-angiotensine-aldostérone en empêchant la transformation de l'angiotensine I (inactive) en angiotensine II (qui a un pouvoir vasopresseur puissant), et ceci en se fixant à la place de l'angiotensine I sur les sites de fixation de l'enzyme de conversion, ce qui empêche la transformation en angiotensine II.

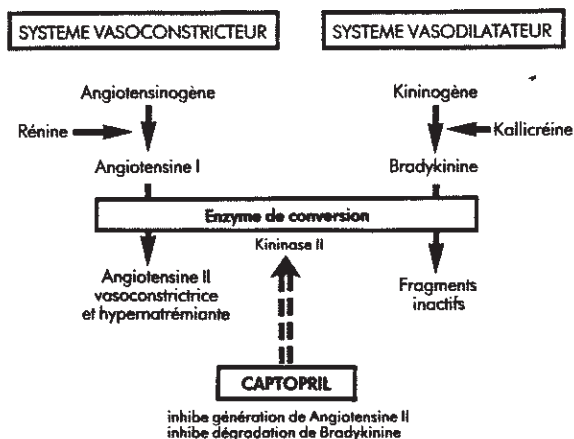
Le blocage de l'enzyme de conversion par le captopril entraîne donc une inhibition de la production d'angiotensine II, ce qui a pour effet une action vasodilatatrice indirecte et une action natriurétique.



Fixation du captopril sur l'enzyme de conversion

Le captopril, en se fixant sur l'enzyme de conversion, empêche la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II.

D'autre part, le blocage de l'enzyme de conversion par le captopril entraîne l'accumulation de la bradykinine, hormone normalement dégradée par l'enzyme de conversion, et qui a des propriétés vasodilatatrices et natriurétiques bien connues.



Rôle de l'enzyme de conversion

Le captopril entraîne donc une inhibition de la production d'angiotensine II ainsi qu'une inhibition de la dégradation de la bradykinine, ce qui entraîne des effets vasodilatateurs et natriurétiques, ces effets sont utilisés en pathologie dans l'hypertension artérielle ainsi que dans l'insuffisance cardiaque.

II-1 Physiologie du système rénine - angiotensine - aldostérone :

L'angiotensine II est une hormone peptidique qui a une action hypertensive puissante.

Elle agit par son effet vasoconstricteur pour rétablir la pression artérielle en cas de situation brutale (passage à l'orthostatisme par exemple), mais elle agit aussi au niveau rénal (directement en diminuant la perfusion rénale et la filtration glomérulaire ou indirectement en stimulant la sécrétion d'aldostérone) et ceci pour rétablir la pression artérielle dans des situations moins soudaines (pertes de Na⁺ par exemple).

L'angiotensine II participe donc à la régulation de la sécrétion d'aldostérone, et de la filtration glomérulaire.

Elle agit enfin au niveau du cerveau comme l'un des composants humoraux de la régulation centrale de la tension artérielle.

La libération d'angiotensine II est le résultat de l'action de deux enzymes :

- la rénine, mise en réserve dans les granules de stockage des cellules rénales juxta-glomérulaires, et qui peut être libérée dans le plasma par stimulation ;
- l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, qui est une glycoprotéine liée à la membrane des cellules épithéliales vasculaires (principalement au niveau des capillaires pulmonaires)

Ces deux enzymes sont des peptidases dont le rôle est de libérer l'angiotensine II en deux étapes à partir de l'angiotensinogène :

Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu - Val - Ile - His ...
(Angiotensinogène)

↓ Rénine

Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe - His - Leu
(Angiotensine I)

↓ Enzyme de conversion (EC)

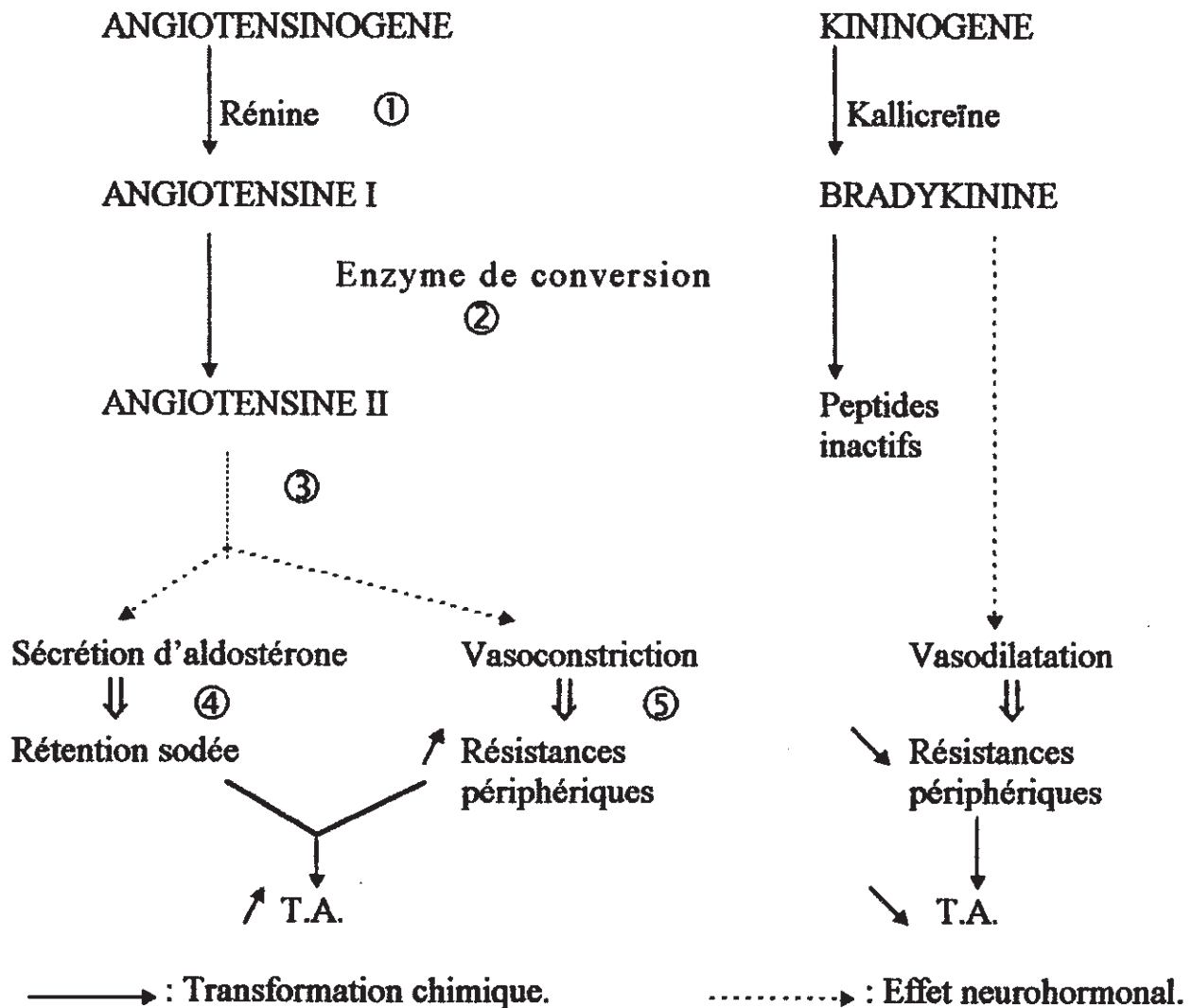
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe
(Angiotensine II)

Clivage de l'angiotensinogène humaine en angiotensines I et II sous l'action du système rénine-angiotensine (1).

La nature et le rôle de ces deux enzymes sont très différents :

- la rénine est une enzyme hautement spécifique dont la présence dans le plasma dépend de facteurs hémodynamiques et neurohormonaux ;
- l'enzyme de conversion est peu spécifique.

II-2 Points d'impacts des antihypertenseurs sur le système rénine - angiotensine :



Inhibition, blocage, ou antagonisme par :

- β -bloqueurs et inhibiteurs de la rénine ①
- inhibiteurs de l'enzyme de conversion ②
- antagonistes de l'angiotensine II ③
- diurétiques ④
- β -bloqueurs, « vasodilatateurs », AHT centraux ⑤

Les antihypertenseurs (AHT), le système rénine-angiotensine et la dégradation des kinines (1).

II-3 Structure et mécanisme d'action du captopril :

II-3-1 Au niveau physiologique :

Le captopril agit sur le système rénine - angiotensine - aldostérone, stimulé dans l'insuffisance cardiaque, en bloquant la synthèse d'angiotensine II, ce qui entraîne :

- une baisse des résistances périphériques par effet vasodilatateur indirect,
- une diminution du « lit volumique » par natriurèse induite par la baisse de synthèse d'aldostérone,
- une vasodilatation accrue par blocage de la dégradation de la bradikinine.

Ce mécanisme d'action du captopril entraîne d'importantes modifications hémodynamiques :

- baisse de la précharge et de la postcharge due à une veinodilatation et à une baisse des résistances artériolaires avec augmentation du débit cardiaque,
- augmentation de la compliance cardiaque par dilatation des grosses artères,
- persistance et même augmentation des effets hémodynamiques lors des traitements au long cours.

II-3-2 Interactions structure - récepteurs :

Le captopril est un dipeptide ayant dans sa structure une partie L - alanyl - L - proline, et sa stéréochimie des centres d'asymétrie (tous -S).

L'originalité du captopril par rapport aux autres IEC réside dans le fait qu'il possède un groupement thiol.

En fait, le captopril est un inhibiteur de la carboxypeptidase A pancréatique, enzyme très voisine de l'enzyme de conversion. Il se lie à la carboxypeptidase A par trois sites :

- un carboxylate qui se fixe à un centre cationique,
- l'oxygène du carboxamide qui établit une liaison hydrogène,
- le thiol qui s'unit au Zn^{++} de la métallo - protéine.

La liaison peptidique fragilisée par Zn^{++} s'hydrolyse pour donner l'angiotensine et le dipeptide His - Leu. Les inhibiteurs sont des analogues de l'état de transition.

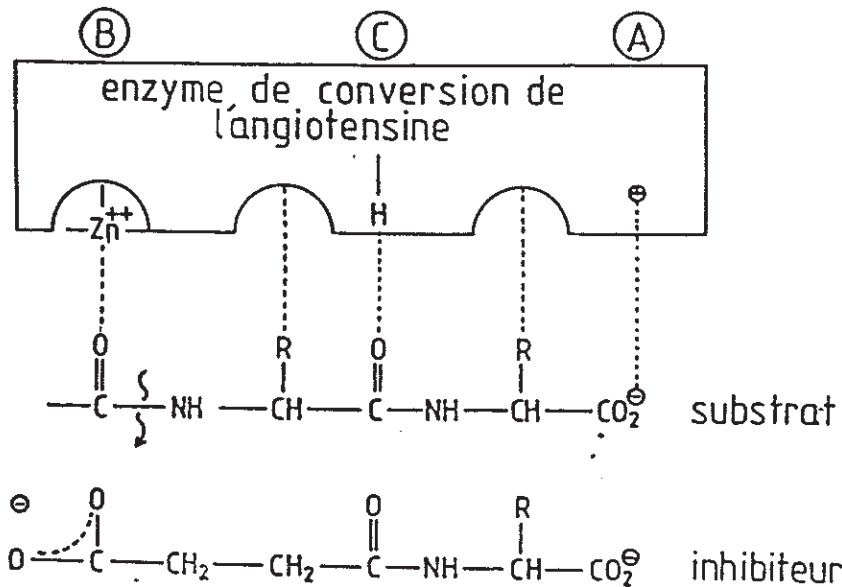
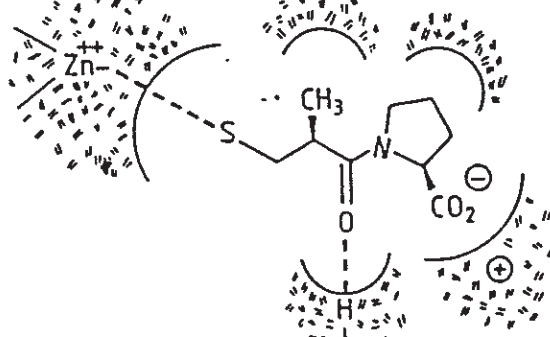


Schéma hypothétique du mode de liaison substrat, produit de la réaction, inhibiteur, avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine (1).

la figure indique la fixation du substrat sur l'enzyme ; puis le résultat de la coupure de la liaison peptidique au niveau du carboxyle activé par Zn^{++} . Un inhibiteur très simple est un succinyl - peptide (ligne 3).

II-3-3 Relation structure - activité :

Cette relation structure - activité découle de l'interaction avec les récepteurs :



Modèle des sites de fixation du captopril sur l'enzyme de conversion (1).

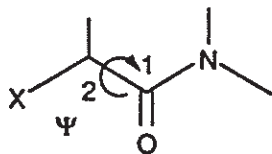
Une caractéristique de ce modèle est la présence du méthyle, avec une certaine orientation, sur le carbone voisin du carboxamide.

Son absence ou l'inversion de sa configuration diminue, sans la détruire, l'activité inhibitrice. Son rôle est, entre autres, de privilégier la conformation du peptide pour laquelle la chaîne est *transoïde*.



Captopril : conformation cisoïde et transoïde

Cet équilibre conformationnel peut être mis en évidence par des mesures R.M.N.(à température ordinaire, on observe par ailleurs un mélange de deux rotamères autour de la liaison amide ; cf. caractéristiques physico - chimiques.)



Captopril : angle dièdre

La valeur de l'angle dièdre ψ (entre plans X - C2 - C1 et C2 - C1 - O) mesure cette orientation, et l'on note une corrélation entre la valeur de ce paramètre et l'affinité de l'enzyme de conversion pour le substrat ou l'inhibiteur.

III/PHARMACOLOGIE :

III-1 Propriétés hémodynamiques :

III-1-1 Hypertension artérielle :

Le captopril est actif dans pratiquement toutes les formes d'hypertension artérielle essentielle ou secondaire, quel que soit leur degré de gravité.

III-1-1-1 Au niveau de l'enzyme de conversion :

Son administration inhibe l'enzyme de conversion, ce qui entraîne :

- une levée de la vasoconstriction induite par le système rénine-angiotensine-aldostérone, diminuant ainsi les résistances périphériques,
- une diminution de la rétention hydrosodée provoquée par l'aldostérone,
- une facilitation de l'action vasodilatatrice et natriurétique de la bradykinine.

III-1-1-2 Chez l'hypertendu :

Le captopril entraîne une baisse proportionnelle de la pression artérielle systolique et diastolique, sans modification de la fréquence ou du débit cardiaque et sans hypotension orthostatique. Cette baisse est progressive dans l'hypertension artérielle essentielle, et elle peut s'étaler sur quatre semaines.

III-1-1-3 Au niveau des gros troncs artériels :

Le captopril entraîne une augmentation de la compliance artérielle, propriété intéressante dans l'hypertension artérielle compliquée d'athérosclérose et dans l'hypertension artérielle systolique.

III-1-1-4 Au niveau du débit rénal et cérébral :

Le captopril augmente le débit rénal et conserve le débit sanguin cérébral.

L'effet antihypertenseur du captopril est comparable à celui de l'hydrochlorothiazide (diurétique thiazidique) ou du propranolol (bêta - bloquant), de plus, cet effet se maintient dans le temps.

III-1-2 Insuffisance cardiaque :

Le captopril est indiqué dans les insuffisances cardiaques avec dilatation ventriculaire gauche réfractaire au traitement diurétique. On observe :

- une baisse de la tension artérielle,
- un ralentissement de la fréquence cardiaque,
- une augmentation des capacités à l'effort.

III-1-2-1 Mécanismes simplifiés de l'insuffisance cardiaque :

Deux mécanismes physiopathologiques interviennent dans l'insuffisance cardiaque, ces deux mécanismes pouvant être liés :

- un travail cardiaque excessif lié à une surcharge volumétrique ou à une augmentation des résistances périphériques,
- une réduction des possibilités motrices du myocarde d'origine ischémique, toxique, dégénérative ou inflammatoire.

L'insuffisance cardiaque déclenche alors des mécanismes d'adaptation pour maintenir un débit suffisant à la perfusion des tissus, entraînant une augmentation de la fréquence cardiaque ainsi que de la force contractile, le ventricule se dilate et s'hypertrophie, les pressions de remplissage augmentent.

Si les causes de l'insuffisance cardiaque persistent, l'adaptation devient insuffisante, ce qui entraîne une chute du débit et une anoxie tissulaire, des oedèmes et une rétention en amont.

L'artère rénale subit une baisse de sa pression de perfusion, ce qui entraîne une stimulation de l'appareil juxtaglomérulaire et du système rénine-angiotensine. Ceci se traduit par une augmentation des résistances périphériques et une rétention hydrosodée.

III-2 Pharmacocinétique :

III-2-1 Chez le sujet sain :

L'absorption du captopril par voie orale est rapide, des quantités de captopril sont décelables 15 minutes après son administration.

La concentration maximale de captopril est obtenue environ 1 heure après administration.

L'absorption minimale moyenne est d'environ 75 %.

La fixation protéique du captopril est d'environ 30 %.

Le captopril est transformé dans l'organisme en plusieurs dérivés (disulfures de captopril, complexes entre captopril et dérivés endogènes possédant des fonctions sulfhydriles, notamment certaines protéines comme la cystéine et le glutathion).

La demie-vie d'élimination apparente est d'environ 4 heures.

Dans le sang circulant, le captopril se présente sous deux formes :

- le captopril libre dont la demie-vie d'élimination est courte (1,7 heures après administration orale et 1,9 heures après administration intraveineuse),
- le captopril combiné, sous forme essentiellement de disulfure de captopril et de captopril combiné avec les composés thiols endogènes dont la demie-vie est plus longue, (9,4 heures après administration intraveineuse, 12 heures après administration orale).

Ces dérivés combinés peuvent se retransformer en captopril libre et paraissent constituer un véritable réservoir.

L'élimination du captopril est essentiellement rénale (75 %, dont 50 % sous forme inchangée, le reste sous forme de dérivés conjugués et de disulfure dimère de captopril). Une certaine fraction de captopril subit une élimination biliaire et se retrouve dans les fèces (15 % environ).

III-2-2 Chez les sujets hypertendus :

Les résultats obtenus sont identiques en ce qui concerne l'absorption et le sort du médicament au 1^{er} comme au 10^e jour du traitement.

Il n'existe pas d'accumulation du captopril après le 4^e jour.

III-2-3 Chez les insuffisants rénaux :

La demie-vie dans le sang est inversement proportionnelle à la clairance de la créatinine endogène. Une relation presque identique est retrouvée entre la demie-vie du captopril inchangé dans le sang et la clairance de la créatinine.

Chez ces patients, il existe donc un risque d'accumulation de captopril et il est recommandé d'adapter les posologies en fonction du degré de l'insuffisance rénale.

III-2-4 Chez les patients dialysés :

Le captopril est dialysable, la clairance moyenne totale au cours de l'hémodialyse est de $76 \pm 4,6$ ml/min.

Environ 40 % de la dose administrée est éliminée durant 4 heures de dialyse.

III-2-5 Concentration de captopril dans le lait des femmes allaitantes :

Les concentrations maximales de captopril libre dans le lait maternel sont d'environ 1% de celles du sang, et sont atteintes 3 heures plus tard que celles du sang.

III-3 Effets sur l'équilibre hydro - électrolytique :

Le captopril augmente le taux de rénine plasmatique et diminue le taux plasmatique d'aldostérone.

On observe une augmentation de l'excrétion hydrosodée, ainsi qu'une augmentation de la kaliémie. Ceci se traduit par une correction des pertes potassiques induites par les diurétiques thiazidiques lors d'association captopril - hydrochlorothiazide.

III-4 Autres effets :

Le captopril et plus généralement les inhibiteurs de l'enzyme de conversion interfèrent avec le système adrénergique.

IV/ MODALITES THERAPEUTIQUES :

IV-1 L'hypertension artérielle :

Le principal objectif du traitement de l'hypertension artérielle (HTA) est de prévenir les complications cardio - vasculaires de l'HTA.

Avant tout traitement, il faut s'assurer de la permanence de l'élévation tensionnelle dans de bonnes conditions de repos en prévoyant éventuellement un enregistrement Holter tensionnel. Le bilan initial vise à dépister une cause d'hypertension artérielle secondaire, à analyser les autres facteurs de risque cardio-vasculaire et à rechercher des signes de retentissement cardiaque et vasculaire de cette HTA.

Les dosages de kaliémie, créatininémie, glycémie et la recherche de protéinurie sont systématiques et doivent être complétées par d'autres examens si le terrain et la sévérité de l'HTA le nécessitent.

IV-2 Choix du traitement :

Des conseils diététiques doivent être proposés en première intention lorsqu'il existe un excès pondéral important ou une alimentation très riche en sel ; leur efficacité préventive reste cependant mal connue. C'est également le seul traitement préconisé en cas d'HTA limite.

Un traitement médicamenteux est indiqué en cas d'HTA confirmée (PA systolique > 160 mm Hg ou PA diastolique > 95 mm Hg) persistant après un éventuel essai diététique. Il paraît logique de prescrire d'abord une monothérapie. Le choix du traitement de première intention dépend du contexte clinique et il faut revoir après quelques semaines en fonction de l'évolution tensionnelle et de l'apparition éventuelle d'effets indésirables provoqués par le traitement.

Lorsqu'une monothérapie est insuffisante, il faut associer plusieurs antihypertenseurs : les spécialités associant plusieurs principes actifs permettent alors de faciliter la prise du traitement. En cas de résistance au traitement, il faut en premier lieu vérifier la permanence de l'HTA (une apparente résistance au traitement peut correspondre à une simple montée tensionnelle au milieu médical sans HTA permanente), s'assurer de l'observance du traitement et revoir le problème du bilan étiologique.

IV-3 Intérêts thérapeutiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion :

Ces médicaments sont très efficaces dans de très nombreuses formes d'hypertension, modestes, sévères, ou résistantes aux autres thérapies.

Ils peuvent être utilisés comme médicaments de première intention, même chez le sujet âgé.

Ils peuvent être associés avec profit avec la plupart des médicaments de l'hypertension :

- bêta-bloqueurs,
- antagonistes calciques,
- diurétiques (sauf épargneurs de K).

Ils ne présentent pas les effets secondaires périphériques (« vasodilatateurs »), centraux (sédation, activité sexuelle), ou métabolique (hyperuricémie, hypokaliémie) d'autres classes d'AHT.

IV-4 Captopril :

IV-4-1 Indications :

- Hypertension artérielle à tous les stades.
- Insuffisance cardiaque congestive.

IV-4-2 Mode d'emploi et posologie :

Le captopril sera administré en dehors des repas.

IV-4-2-1 Hypertension artérielle :

La posologie habituelle est de 50 mg de captopril par jour en deux prises de 25 mg matin et soir. Cette posologie peut être portée à 100 mg de captopril par jour en deux prises.

Certaines hypertensions peuvent nécessiter des doses plus importantes de l'ordre de 150 mg de captopril par jour en trois prises , ces doses pouvant ensuite être réduites et réparties en deux prises.

Il est conseillé de ne pas dépasser la dose de 300 mg de captopril par jour.

Chez les patients en hypovolémie, fortement déplétés en sodium ou dont l'hypertension est très rénine dépendante, la dose initiale sera réduite au moins de moitié et les doses suivantes adaptées à la baisse tensionnelle observée.

IV-4-2-2 Insuffisance cardiaque congestive :

Le captopril sera ici utilisé en association avec le traitement digitalique et le traitement diurétique à doses optimales.

La dose initiale de captopril devra être faible, surtout si le patient présente une pression artérielle normale ou basse au départ.

Il est recommandé de commencer le traitement avec 6,25 mg de captopril (soit $\frac{1}{4}$ de comprimé si le comprimé est dosé à 25 mg de captopril) avec une surveillance de la tension pendant deux heures, puis 12,50 mg de captopril (soit $\frac{1}{2}$ comprimé dosé à 25 mg de captopril), toujours sous surveillance tensionnelle, puis 25 mg de captopril (soit 1 comprimé dosé à 25 mg de captopril).

La dose qui sera retenue sera celle qui n'abaissera pas la pression artérielle systolique en position orthostatique au-dessous de 90 mm Hg, celle-ci sera administrée trois fois par jour, en dehors des repas.

La dose efficace usuelle se situe entre 50 mg et 150 mg par jour.

Il est conseillé de ne pas dépasser la dose de 300 mg par jour.

Une fois l'état clinique et fonctionnel du patient stabilisé, la dose journalière pourra être administrée en 2 prises quotidiennes.

IV-4-2-3 Posologie :

Elle sera adaptée en cas d'insuffisance rénale et sera ajustée au degré de cette insuffisance.

Pour éviter l'accumulation du captopril, il est conseillé les posologies suivantes

Clairance de la créatinine ml / min / 1,73 m ²	Dose journalière maximale totale (mg)
>80	450
80-41	300
40-21	150
20-11	75
<10	37,5

IV-4-3 Contre-indication :

Allergie connue à ce médicament.

IV-4-4 Mise en garde :

Le captopril ne doit pas être utilisé comme antihypertenseur de première intention compte tenu des incidents et accidents susceptibles de survenir au cours de l'utilisation de ce médicament.

IV-4-5 Précautions d'emploi :

IV-4-5-1 Traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque congestive :

- En cas de suspicion de déplétion sodée, d'hypovolémie, ou d'activité rénine plasmatique élevée, le traitement sera institué avec prudence (voir posologie),

- En cas d'insuffisance rénale, la posologie du captopril sera ajustée au degré de cette insuffisance (voir posologie),

- Chez certains malades présentant des facteurs de risque :

Maladies de système, néphropathies glomérulaires, désordres immunologiques, insuffisance rénale importante, chez les malades recevant des médicaments immuno-suppresseurs et/ ou à potentiel leucopéniant, et chez ceux devant recevoir des doses de captopril supérieures à 150 mg par jour, le rapport bénéfice/ risque sera bien pesé avant l'utilisation du produit et une surveillance rénale et hématologique régulière sera instituée :

- recherche de protéinurie avant le début du traitement et mensuellement au cours de la première année. Si présente, cette protéinurie sera quantifiée sur les urines de 24 heures et son évolution sera suivie,

- surveillance hématologique régulière (bimensuelle, pendant les trois premiers mois de traitement).

- La kaliémie sera surveillée, spécialement en cas d'insuffisance rénale,
- En cas d'anesthésie pour intervention majeure ou lors d'anesthésies pratiquées avec des agents à potentiel hypotenseur, le captopril peut provoquer une hypotension qui sera corrigée par une expansion volémique.

IV-4-5-2 Traitement de l'insuffisance cardiaque congestive :

- Chez les patients présentant une pression artérielle normale ou basse avant l'administration du produit, une chute marquée des chiffres tensionnels peut être observée lors de l'administration des premières doses de captopril. Chez ces patients, la pression artérielle sera suivie très attentivement ; l'administration de faibles doses de départ est ici fortement conseillée (voir posologie).
- Lorsque l'amélioration fonctionnelle est bonne, on recommandera au malade de ne reprendre que progressivement son activité physique.

IV-4-5-3 Grossesse :

Il n'a pas été mis en évidence avec l'utilisation de captopril d'effet tératogène expérimental chez le lapin, le hamster et le rat.

Cependant, l'innocuité n'ayant pas été démontrée chez la femme enceinte, le captopril ne sera utilisé pendant la grossesse que si le bénéfice attendu du traitement justifie le risque potentiel encouru par le fœtus.

Allaitement :

La prudence reste de règle chez la femme allaitante, l'effet chez le nourrisson des doses minimales passant dans le lait maternel n'ayant pas été déterminé.



IV-4-6 Interactions médicamenteuses :

Un traitement par bêta-bloquant ne sera jamais arrêté chez un hypertendu atteint d'insuffisance coronarienne : le captopril sera ajouté au bêta-bloquant.

L'association du captopril avec des sels de potassium ou des médicaments d'épargne potassique expose au risque d'hyperkaliémie, surtout en cas d'insuffisance rénale.

L'association du captopril avec des médicaments immuno-suppresseurs et/ ou à potentiel leucopéniant doit être évitée.

En cas d'associations médicamenteuses multiples, une attention toute particulière sera portée à la tolérance hématologique et rénale.

IV-4-7 Effets indésirables :

1 - La plupart des effets indésirables sont anodins et disparaissent à l'arrêt ou à la diminution du traitement. Les troubles sont peu fréquents lorsque les doses de captopril sont inférieures ou égales à 150 mg par jour.

2 - D'autres sont rares, mais peuvent survenir chez les patients « à haut risque » :

- protéinurie ;
- altération passagère de la fonction rénale, notamment en cas de sténose de l'artère rénale sur rein unique ou de sténose bilatérale serrée ;
- neutropénie.

3 - Les effets indésirables du captopril sont d'autant plus fréquents que la dose administrée est importante, notamment supérieure à 150 mg / jour).

IV-4-8 Surdosage :

Le captopril est dialysable.

Une hypotension importante peut être palliée par une perfusion i.v. de solution salée isotonique.

IV-4-9 Conditions d'une substitution à un autre antihypertenseur :

- Salidiurétique : instaurer le traitement au captopril à doses initiales faibles (12,5 mg), ou trois jours après l'arrêt du salidiurétique. Réintroduire le diurétique si besoin est.

- Bêta-bloquant : arrêter progressivement le bêta-bloqueur (sauf chez l'insuffisant coronarien).

- Méthyl-dopa et « vasodilatateurs » : arrêt un jour avant l'instauration du captopril.

- clonidine : instaurer le traitement, et arrêter progressivement la clonidine.

V/ BUTS DE LA MANIPULATION :

Le groupement -SH confère, aux molécules qui le contiennent, des propriétés antioxydantes . En effet, les thiols (R-SH) interviennent à tous les niveaux de l'organisme. Ces composés jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'oxydo-réduction, ainsi le glutathion (G-SH) qui, en perdant un H⁺, forme des liaisons disulfides -S-S- et participe ainsi à la réduction des métabolites oxydés.

Nous avons vu que le captopril est un médicament qui joue un rôle au niveau cardiaque sur la pression artérielle.

De part sa structure, le captopril est un médicament original, en effet c'est le seul IEC qui possède une fonction thiol (-SH).

Cette fonction thiol a normalement la propriété d'être « piègeuse » de radicaux libres qui sont des molécules nocives qui peuvent apparaître lors d'un infarctus du myocarde et causer des dégâts considérables lors de la reperfusion de ce tissu (cf. deuxième partie).

Si cette fonction thiol agit efficacement, on peut penser qu'un patient traité par le captopril bénéficie non seulement de l'effet antihypertenseur de ce médicament mais aussi d'un effet protecteur vis à vis des radicaux libres.

Le captopril est un inhibiteur de l'enzyme de conversion. Une de ses caractéristiques principales, qui est la base de sa grande affinité avec l'enzyme de conversion, est la présence d'un groupement sulfhydryle qui complexe l'ion Zn de l'enzyme (3).

L'inhibition compétitive de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par le captopril entraîne une baisse de la tension artérielle.

Plus récemment, on a découvert que le captopril pouvait protéger le tissu cardiaque contre les arythmies de reperfusion, cette dernière propriété ne se retrouvant pas chez les autres inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Or le captopril est le seul inhibiteur de l'enzyme de conversion qui possède dans sa structure une fonction thiol (-SH), ceci indique que c'est cette fonction serait responsable de cette activité (3).

De plus, il est prouvé actuellement que le dysfonctionnement cardiaque post-ischémique est du, au moins en partie, à la production de radicaux libres oxygénés.

Il a été démontré que certaines substances contenant une fonction thiol (R-SH) comme la penicillamine, la N-acétylcystéine et d'autres ont une activité inhibitrice sur des réactions faisant intervenir l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ ou d'autres radicaux oxygénés.

Une autre étude sur le captopril et l'énalaprilate a été faite pour savoir si ces deux inhibiteurs de l'enzyme de conversion pouvaient inhiber le radical anion superoxyde, avec des systèmes producteurs de radicaux libres comme la xanthine-xanthine oxydase (4). Il en ressort que seul le captopril est capable, par sa fonction thiol (que ne possède pas l'énalaprilate), d'agir sur la production de radicaux libres.

On peut donc penser que le captopril, par sa fonction thiol originale, est capable d'une action bénéfique de protection du tissu cardiaque, autre que sur l'hypertension, qui serait l'inhibition de certains radicaux libres oxygénés.

Pour démontrer cette propriété du captopril, nous allons comparer l'effet « piègeur » du captopril par rapport à deux molécules dont cet effet est connu et quantifié et qui serviront de référence, le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N oxyde

(DMPO), et le 1,1-diphényl 2-picryl-hydrazyl (DPPH) , nous déterminerons ainsi la CI50 du captopril.

Cependant il faudra s'assurer que cet effet est bien dû à la fonction thiol du captopril, pour ceci, nous allons comparer l'effet « piègeur » de radicaux libres entre le captopril et le captopril méthylé au niveau de la fonction thiol, la méthylation ayant pour but d'inhiber l'effet de la fonction thiol sur les radicaux libres. Ces effets seront comparés aux deux molécules de référence, la DMPO et la DPPH.

Cette méthylation sera une catalyse par transfert de phase.

Les mesures seront effectuées par résonance paramagnétique électronique (RPE) qui est une méthode permettant de détecter et de quantifier la présence de radicaux libres, auparavant nous aurons initié la formation de ces radicaux libres dans le milieu expérimental, et ceci car les radicaux libres ont une durée de vie très courte (cf. troisième partie).

LES RADICAUX LIBRES

I/ PRESENTATION DES RADICAUX LIBRES :

I-1 DEFINITION :

Les radicaux libres (RL) sont des molécules ou atomes très instables possédant un électron célibataire non apparié sur leur couche externe. Cet électron non couplé, par un mouvement de rotation sur lui-même, induit un champ magnétique appelé « SPIN », c'est cette propriété qui sera utilisée en résonance paramagnétique électronique (RPE), nous verrons de quelle manière.

Dans les molécules, les électrons sont habituellement réunis en paires ou doublets électroniques. Ces doublets électroniques sont plus stables que deux électrons isolés car l'appariement de deux électrons de spin opposés permet l'annulation de leurs champs magnétiques réciproques.

Une molécule ou un atome stables possèdent un nombre pair d'électrons externes, et ceux-ci sont appariés entre électrons de SPIN opposés.

Un radical libre est donc une espèce chimique neutre ou chargée, dont la couche périphérique contient un électron non couplé dit célibataire.

Le nombre total d'électrons d'un radical libre est donc impair (5).

Exemple, molécule d'eau H₂O :



L'oxygène est entouré de quatre paires d'électrons (doublets), deux paires liantes établissent les liaisons OH et deux paires non liantes.

I-2 PROPRIETES DES RL :

I-2-1 Réactivité des RL :

L'électron externe non apparié du RL confère à celui-ci une grande réactivité car cet électron développe un champ magnétique et va chercher une union avec un électron arraché à l'orbitale externe d'une autre molécule stable. Celle-ci deviendra à son tour un RL.

Un radical libre possède donc une réactivité très importante, et va déclencher une cascade de réactions très rapides (de l'ordre de 10^{-4} secondes) au sein de la cellule dans laquelle il est formé. Cette cascade de réactions va mettre en jeu un nombre important de molécules physiologiques, celles-ci passeront de l'état radicalaire à l'état stable très rapidement, mais ce passage peut entraîner des dénaturations de ces molécules, et le métabolisme cellulaire peut en être largement affecté.

La production d'un seul radical libre au sein d'une cellule peut donc engendrer des désordres importants .

Cette grande réactivité se manifeste aussi bien sur le plan énergétique que cinétique.

I-2-2 Energie des RL :

Pour retrouver une stabilité, un radical libre va essayer de ne plus avoir d'électrons célibataires sur ses couches électroniques, pour cela, il va avoir deux types de comportements : (7)

- comportement réducteur par perte d'un électron,
par exemple le radical $\text{COO}\cdot^-$

- comportement oxydant par gain d'électrons,
par exemple le radical $\text{OH}\cdot$ (radical hydroxyle).

Il est à noter que certains radicaux libres peuvent aussi bien avoir un comportement réducteur qu'un comportement oxydant et ceci en fonction du composé avec lequel il sont en présence, c'est le cas notamment de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$:

- en présence d'ions cuivriques, il aura un comportement réducteur,



- en présence d'ions ferreux, il aura un comportement oxydant,



Par ailleurs, un radical libre peut aussi s'oxyder lui-même, c'est une réaction dite de dismutation, c'est le cas de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ qui jouera aussi bien le rôle d'oxydant que de réducteur :



I-2-3 Cinétique des RL :

Les radicaux libres ont un électron non couplé sur leur couche périphérique, ceci favorise leur rapprochement avec une autre molécule lors de collisions (7).

La répulsion coulombienne qui intervient entre les couches périphériques du radical libre et d'une molécule stable lors de rapprochements sera plus faible, ce qui favorisera la collision et donc la vitesse de la réaction.

Les réactions faisant intervenir les radicaux libres sont de ce fait de très courte durée de l'ordre de 10^{-4} secondes.

I-3 FORMATION DES RL :

Un radical libre peut se former à partir d'un atome par réduction qui correspond à un gain d'un électron sur ses couches périphériques, donnant un radical chargé négativement, ou alors par oxydation qui correspond à une perte d'un électron et qui va donner un radical chargé positivement.

Mais un radical libre peut aussi se former à partir d'une molécule par scission homolytique d'une liaison covalente (une liaison covalente entre deux atomes se fait par mise en commun de deux électrons de SPINS opposés), cette scission entraîne la formation de deux radicaux libres car chaque atome prend avec lui un électron : (8)



Cette scission est différente de la scission hétérolytique classique qui elle produit deux anions car l'un des deux atomes prend les deux électrons de la liaison covalente, et l'autre n'en prend aucun :



A reçoit les deux électrons de la liaison covalente et devient un anion à charge négative, tandis que B a un défaut de charges négatives et devient un cation à charge positive.

I-3-1 RL provenant de l'oxygène :

Les radicaux libres oxygénés représentent la forme chimique la plus importante des radicaux libres, mais surtout la plus toxique.

L'oxygène est un élément indispensable à la vie terrestre aérobie et il se trouve partout en grande quantité (eau, air...), cet oxygène est à l'origine de la formation de radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire. Cette formation de radicaux libres oxygénés est physiologique, mais ceux-ci peuvent s'avérer toxiques.

Il faut distinguer les radicaux libres oxygénés, qui sont des molécules de grandes tailles, des « formes actives de l'oxygène », qui sont des molécules de petite taille non carbonées.

I-3-1-1 RL oxygénés :

Les principaux radicaux libres oxygénés sont : (5)

- les radicaux peroxyles $\text{ROO}\cdot$,
- les radicaux alcoxyles $\text{RO}\cdot$.

Ils proviennent principalement des acides gras insaturés tels que l'acide arachidonique, mais ils peuvent provenir de l'action d'un radical libre tel que l'ion hydroxyle ainsi que de la réponse à des stimuli membranaires spécifiques.

Ces radicaux libres oxygénés sont des formes intermédiaires instables.

I-3-1-2 Oxygène de l'air :

Normalement, le métabolisme de l'oxygène dans l'organisme se fait par production d'eau après une réduction tétravalente qui est catalysée par les cytochromes oxydases : (8), (9), (10)



La production d'ATP au cours de la respiration cellulaire fournit les électrons échangés au cours de cette réaction.

Il arrive cependant que des réductions mono- bi- et trivalentes donnent naissance :

- à l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ par réduction monovalente,
- au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par réduction bivalente,
- au radical hydroxyl $OH\cdot$ par réduction trivalente.

L'oxygène moléculaire étant par ailleurs peu réactif et ses réactions principalement avec des espèces paramagnétiques, avec des donneurs d'électrons ou avec la lumière.

Enfin, l'oxygène moléculaire joue le rôle de substrat pour des enzymes telles que les oxygénases ou les oxydases, ou le produit d'enzymes telles que la Superoxyde Dismutase ou les catalases.

I-3-1-3 L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde se forme à partir de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire : (12), (5), (11)



Cette réaction demande un apport d'énergie et se fait principalement de façon enzymatique :

- lors de la respiration cellulaire par la cytochrome oxydase mitochondriale,
- lors de la phagocytose par la NaDPH oxydase,
- lors de phénomènes de détoxication par la xanthine oxydase et le cytochrome P450.

- lors du métabolisme de certaines molécules étrangères au niveau des corticosurrénales.

Ce radical est relativement peu réactif, il réagit principalement avec des donneurs d'électrons comme les protons H^+ , ou avec des espèces paramagnétiques.

I-3-1-4 Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène peut être formé secondairement à la dismutation de l'anion superoxyde en présence d'ions H^+ avec formation d'oxygène :



Cette réaction peut se produire spontanément dans l'organisme, mais elle est plus importante en présence d'une enzyme : la Superoxyde Dismutase (SOD).

Mais le peroxyde d'hydrogène peut aussi être formé à partir de l'eau sous l'action de radiations ionisantes qui vont fournir l'énergie nécessaire.

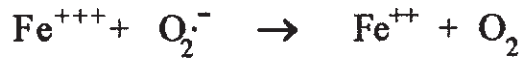
Ce n'est pas un radical libre, mais il est très réactif et a un fort pouvoir oxydant qui lui confère une certaine toxicité.

Ce pouvoir oxydant se manifeste en présence d'ions ferreux Fe^{++} , par la réaction de FENTON :



Le peroxyde d'hydrogène se décompose pour donner un ion hydroxyle OH^- inoffensif et surtout un radical hydroxyle $OH\cdot$ redoutable, capable d'attaquer les structures organiques les plus stables. Cette réaction s'interrompt lorsque le fer ferreux s'épuise, mais l'anion superoxyde peut régénérer le fer

ferreux Fe^{++} à partir du fer ferrique Fe^{+++} formé lors de la réaction, il y a donc entretient de la réaction de FENTON et augmentation de production de radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$ toxique.



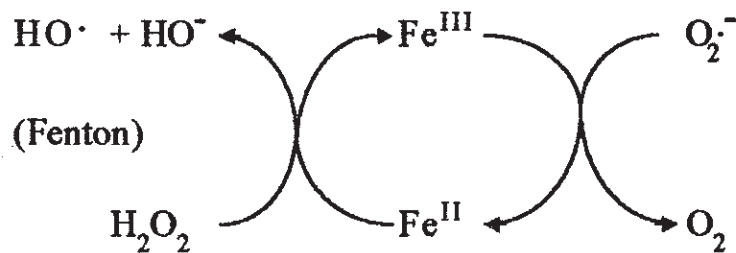
D'autre part, le peroxyde d'hydrogène peut réagir lui-même avec l'anion superoxyde pour former le radical hydroxyle, c'est la réaction d'HABER et WEISS, qui est catalysée par le fer :



On voit donc que la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène, d'anion superoxyde, et de fer permet la production de radical hydroxyle.

On a vu que dans l'organisme, il y avait production de peroxyde d'hydrogène à partir de de l'anion superoxyde et ceci en présence de SOD qui joue le rôle de catalyseur, cette réaction est considérée comme une défense naturelle de l'organisme contre la toxicité de l'ion superoxyde qui est ensuite dismuté en eau et en oxygène par des catalases.

Il n'en reste pas moins que le peroxyde d'hydrogène reste toxique par la réaction de FENTON : (9)



I-3-1-5 Le radical hydroxyle : OH•

Le radical hydroxyle se forme à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction d'HABER et WEISS vue précédemment, ou alors sous l'influence de la lumière U.V. , ou encore par la décomposition de l'eau sous l'action de radiations ionisantes (rayons X par exemple), ou enfin à partir de nombreux polluants comme le tétrachlorure de carbone CCl₄, l'amiante, la cigarette, ...

Ce radical est le plus instable des radicaux libres provenant de l'oxygène, et de ce fait le plus réactif, il agit en effet sur les protéines, les lipides, l'ADN et les oses, entraînant de multiples dommages.

1 — Réactions d'auto-oxydation

Flavines (FADH₂, FMNH₂)
 Quinones
 Composés aromatiques nitrés
 Mélanine
 Groupements thiols
 Tétrahydroptéridines

2 — Réactions enzymatiques et protéines

Aldéhyde oxydase
 Cytochrome P450
 Ferrédoxine (P 430)
 Hémoglobine
 Indolamine dioxygénase
 NADH — Cytochrome b 5 réductase
 NADH — Cytochrome P 450 réductase
 Peroxydase
 Tryptophane dioxygénase
 Xanthine oxydase

3 — Origines cellulaires

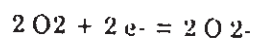
Chaîne respiratoire mitochondriale et microsomale
 Photosystème des chloroplastes
 Leucocytes et macrophages lors de la phagocytose

4 — Facteurs environnementaux

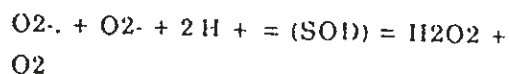
Ultra-violeta
 Ultrasons
 Rayons X
 Rayons γ
 Ions métalliques
 Médicaments

figure 1 : différentes sources de radicaux superoxydes (13)

REACTION N° 1



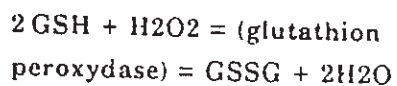
REACTION N° 2



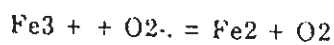
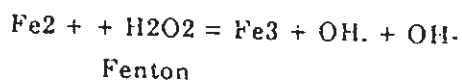
REACTION N° 3



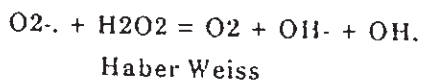
REACTION N° 4



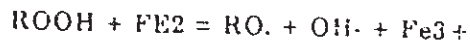
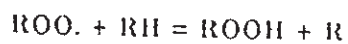
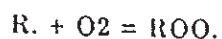
REACTION N° 5



REACTION N° 6



REACTION N° 7



REACTION N° 8

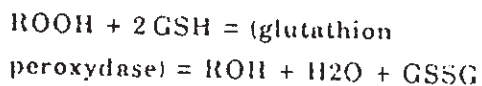


figure 2 : réactions radicalaires (8)

I-3-1-6 L'oxygène singulet : $1O_2$

Ce radical est une forme « excitée » de l'oxygène moléculaire qui résulte d'une modification de sa configuration électronique sans changement du nombre total de ses électrons (14).

Il existe deux types d'oxygène singulet :

- l'oxygène singulet qui se trouve dans les milieux biologiques, et qui a une durée de vie de 10^{-6} secondes ;

- un deuxième type d'oxygène singulet de durée de vie plus courte (10^{-11} secondes) peut être produit sous l'effet de radiations au cours des expériences de photochimie. Il présente deux électrons célibataires de spins opposés.

L'oxygène singulet n'a pas d'électrons célibataires sur sa couche électronique externe, il est cependant assimilé à un radical libre du fait de sa forte réactivité qui est à l'origine de la formation de radicaux libres.

I-3-2 Sources physiologiques des RL :

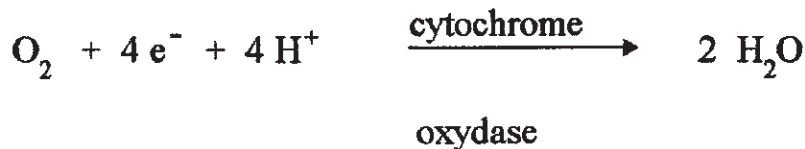
La production de radicaux libres est permanente au sein de l'organisme, principalement liée au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction au niveau des mitochondries ou lors de phagocytoses.

Ils peuvent aussi se former après exposition aux radiations ou à certaines espèces chimiques au cours de mécanismes de détoxification (7), (5), (8).

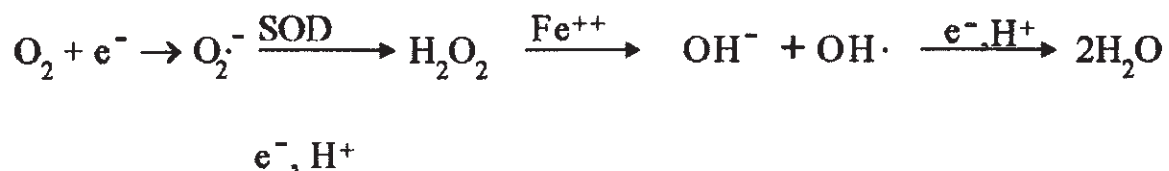
I-3-2-1 La chaîne respiratoire mitochondriale :

La principale source d'énergie des cellules vivantes en aérobie est la respiration cellulaire, cette source d'énergie est apportée sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), elle se fait au niveau de la mitochondrie et comporte une réduction de l'oxygène en eau ; dans cette réaction, les électrons sont déplacés par paires.

L'apparition de radicaux libres à ce niveau est due à des perturbations du transport des électrons. L'oxygène moléculaire est en effet capable d'accepter quatre électrons pour être réduit en eau et ceci par l'intervention de la cytochrome oxydase mitochondriale :



Cependant, une faible part de l'oxygène (5%), fait l'objet d'une réduction partielle monovalente (un seul électron) avec production de radicaux libres oxygénés superoxydes, de peroxyde d'hydrogène et d'ions hydroxyles :



Les radicaux libres sont donc des produits physiologiques, mais potentiellement toxiques, de la respiration cellulaire.

I-3-2-2 La phagocytose :

La phagocytose représente la capacité de certaines cellules telles que les polynucléaires neutrophiles et les macrophages à capturer et ingérer des particules solides inertes ou vivantes du milieu ambiant, ce qui constitue une des armes majeures de la défense antibactérienne.

Les polynucléaires neutrophiles consomment peu d'oxygène à l'état de repos, mais au contact de particules phagocytées il créent une invagination de leur membrane, encerclant ainsi le matériel à détruire (appelé encore phagosome) tout en l'isolant de leur cytoplasme et cette stimulation des neutrophiles s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène (appelé « choc respiratoire ») avec activation de la NaDPH-oxydase.

Cette enzyme catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et exige un apport important en coenzyme réduit NaDPH, apport assuré par le cycle des pentoses.

Il y a ensuite production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$.

L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ont un pouvoir oxydant et participent à la production d'espèces chimiques actives comme le radical hydroxyle $OH\cdot$, et sous l'influence de la myéloperoxydase (enzyme leucocytaire) à la libération d'hypochlorite et de chloramines :



hypochlorite

Les chloramines proviennent de la réaction de l'hypochlorite avec des amines présentes dans le sang telles que glucosamine, taurine, ... :



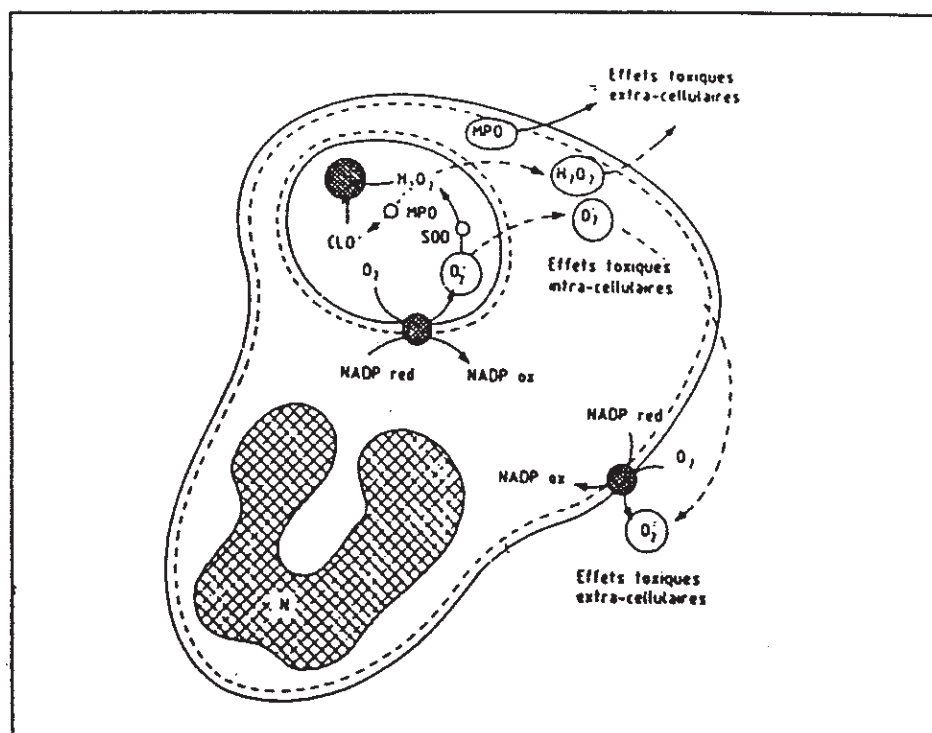
L'hypochlorite peut aussi former du chlorure d'amine en présence de l'ion NH_4^+ :



Le chlorure d'amine a une action oxydante importante, notamment sur les fonctions thiols (-SH) en les transformant en sulfoxydes, et des molécules comme le glutathion qui est importante dans les phénomènes antiradicalaires, peuvent être ainsi réduites.

Les leucocytes activés produisent donc des composés très toxiques tels que l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite et les chloramines. Cet ensemble de réactifs très agressifs vont détruire le matériel phagocyté dans le phagosome.

La NaDPH-oxydase est l'enzyme à l'origine de la production radicalaire des leucocytes activés, car lorsqu'elle manque, l'activité phagocytaire est diminuée, voire abolie.



⊕ = NADPH oxydase

MPO = Myeloperoxydase (neutrophiles, monocytes et macrophages)

SOD = Superoxyde - dismutase

figure 3 : production de superoxyde par les phagocytes.

Il est à noter que la diffusion dans l'environnement extracellulaire des leucocytes activés joue un rôle important dans le processus inflammatoire :

- les médiateurs de l'inflammation (complexes immuns, fractions C5a du complément, leucotriènes B₄...) déclenchent une migration et une activation des polynucléaires neutrophiles comparable à celle observée, sous l'induction des produits bactériens, lors de la phagocytose ;

- les polynucléaires stimulés viennent adhérer à l'endothélium vasculaire, ils peuvent migrer dans les tissus par diapédèse, et en augmentant leur consommation d'oxygène, activer la NaDPH-oxydase membranaire avec production de radicaux libres ;

- contenus dans la poche de phagocytose, ces radicaux libres sont utilisés comme arme antibactérienne, et déversés dans le milieu extracellulaire, ils initient, entretiennent, puis amplifient une réaction inflammatoire ;

- outre l'activation de la NaDPH-oxydase membranaire, la réponse du polynucléaire activé comporte une production de PAF (Platelet Activating Factor), de leucotriènes, métabolites pro-inflammatoires de l'acide arachidonique par la voie enzymatique de la lipooxygénase ;

- la libération de radicaux libres oxygénés, de protéases, de leucotriènes et de PAF déclenche un ensemble complexe d'évènements interactifs qui constituent la réaction inflammatoire .

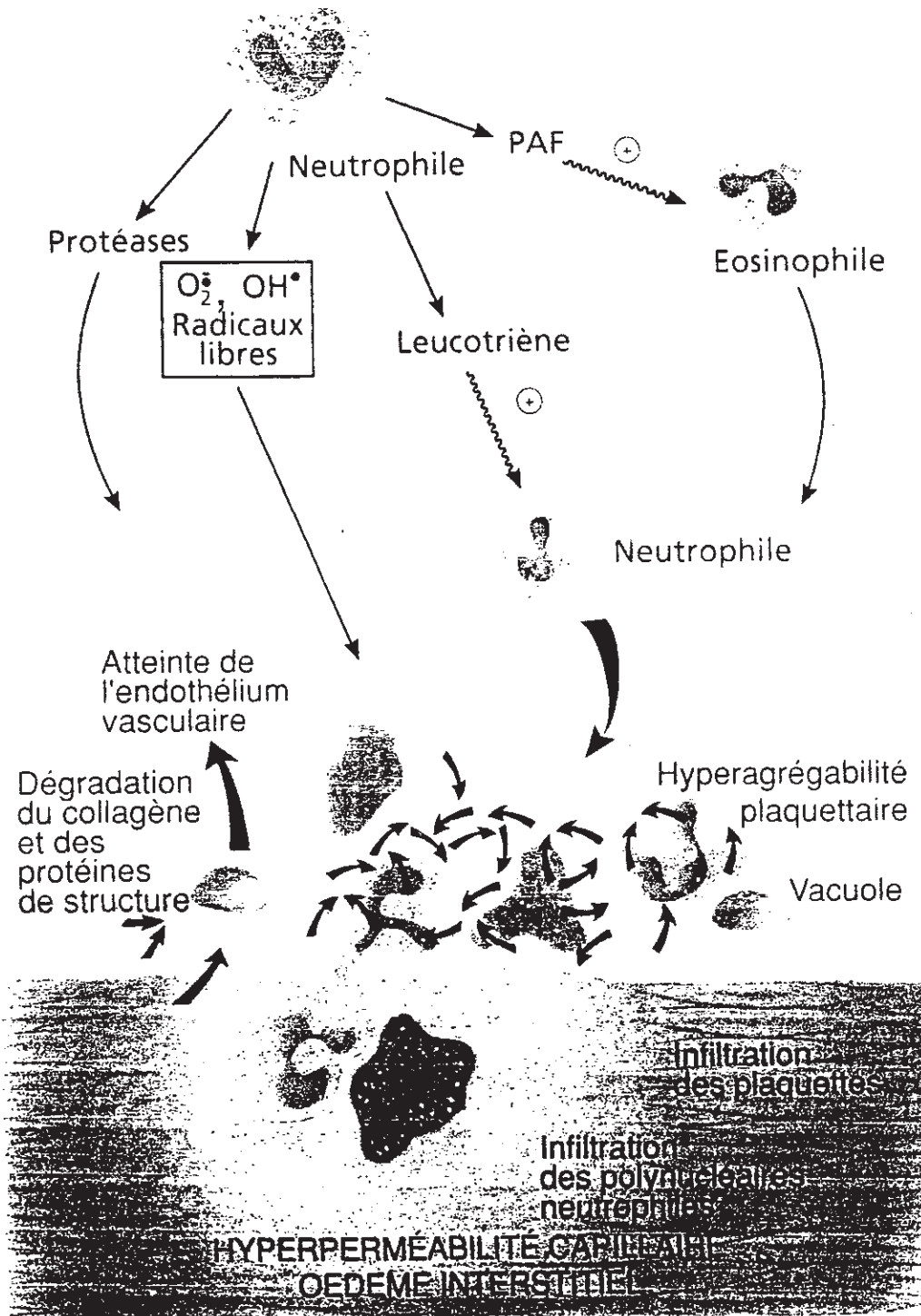


figure 4 : Radicaux libres et réaction inflammatoire

I-3-2-3 La synthèse des prostaglandines :

Les prostaglandines sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique, celui-ci est libéré des phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase A₂.

Au cours de cette synthèse, des radicaux hydroxyles OH· seraient produits à la phase de transformation de l'acide arachidonique en endoperoxydes sous l'effet de la cyclooxygénase.

Ces radicaux hydroxyles interviendraient secondairement en inhibant la cyclooxygénase et en privilégiant la voie métabolique pro-agrégante du thromboxane A₂ sur celle anti-agrégante et vasodilatatrice de la prostacycline (prostaglandine I₂) : (7)

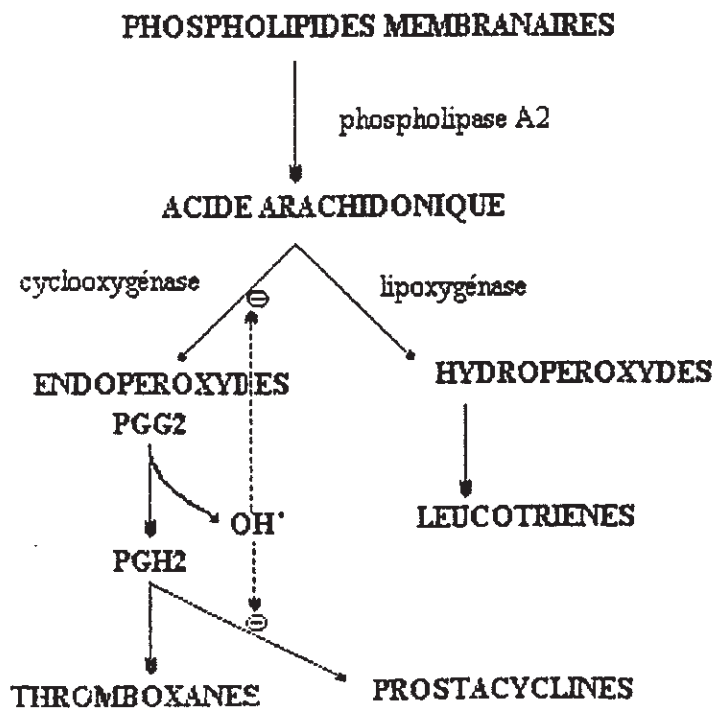
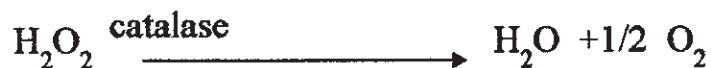
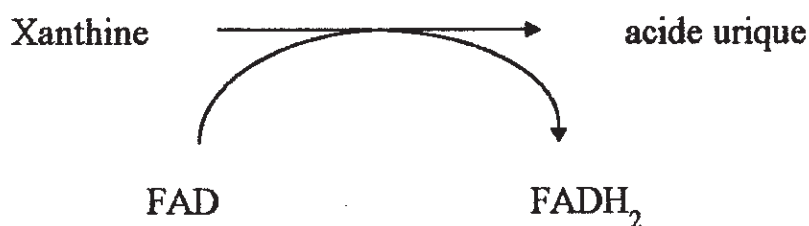


figure 5 : Radicaux libres et hyperagrégation plaquettaire

I-3-2-4 Les réactions enzymatiques :

Des enzymes comme les oxydases et notamment la xanthine oxydase produisent des radicaux libres. Ces oxydases produisent en majorité du peroxyde d'hydrogène, mais aussi du superoxyde.

La xanthine oxydase est une enzyme de dégradation des bases puriques, elle fonctionne avec deux coenzymes Flavine-Adenine-Dinucléotide (FAD) et deux atomes de fer par molécule d'apoenzyme, les hydrogènes fixés sur le FAD de la xanthine oxydase seront transmis à l'oxygène et il se forme du peroxyde d'hydrogène : (5), (15)



I-3-2-5 Les réactions de détoxication :

Les réactions oxydatives de détoxication sont productives de radicaux libres : (7)

- les oxydases contenues dans des organites cellulaires appelés peroxysomes et qui jouent un rôle important dans la détoxication de nombreuses molécules produisent des radicaux libres par transformation de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène ;

- les cytochromes P₄₅₀ qui sont des protéines qui fonctionnent comme les oxydases par transferts monoélectroniques produisent également des radicaux libres et participent à la détoxication de produits tels que les anesthésiques, les pesticides, les polluants..., ainsi qu'à la biosynthèse des stéroïdes (cortisol, aldostérone...).

I-3-2-6 Les rayonnements :

Les rayonnements ionisants tels que les rayons X et les rayons γ produisent des radicaux libres en arrachant, au cours de leur ralentissement, un électron à certaines molécules, ce qui provoque la radiolyse de l'eau contenue dans les tissus exposés. Cela conduit, pour l'eau et en présence d'oxygène à la formation d'anions superoxyde et de radicaux hydroxyle.

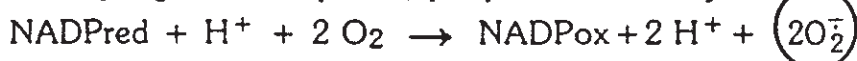
Lorsqu'une molécule absorbe un photon de lumière UV dont l'énergie est inférieure à son énergie d'ionisation, elle devient excitée. Si cette énergie emmagasinée est suffisante, il peut y avoir rupture de liaison, et donc production de radicaux libres, ceci se faisant par différents mécanismes.

Les tissus les plus concernés car les plus exposés sont la peau et surtout l'oeil à cause de l'intensité de son métabolisme.

I. Formes actives de O₂

A. Mécanismes enzymatiques : → O_2^-

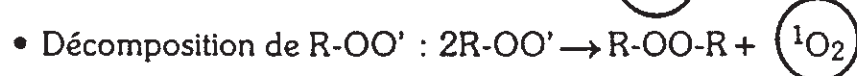
- Activation de la NADPH oxydase (PMN, monocytes-macrophages, éosinophiles, plaquettes, mastocytes)



- Réduction monoélectronique de O₂ : mitochondries, Cyt P450 (foie) cs, xanthine oxydase

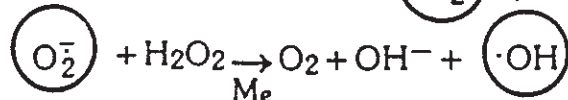
B. Mécanismes non enzymatiques

- Activation photochimique de O₂ (→ $^1\text{O}_2$)



- Radiolyse de l'eau (→ ·OH)

- Réaction secondaire de O_2^- (réaction d'Haber Weiss)



II. Radicaux libres oxygénés (R-O·, R-OO·)

A. Formation *contrôlée* de R-OO· : activités des cyclo-oxygénase et lipoxygénases

B. Formation *non contrôlée* de R-O·, R-OO·, secondaire :

- à la production de O_2^-
- au métabolisme de certains xénobiotiques

figure 6 : mécanismes de formation des radicaux libres (5)

II / PHENOMENES TOXIQUES DES RADICAUX LIBRES :

II-1 Phénomènes toxicologiques :

Certains composés chimiques ont leur catabolisme qui s'accompagne de la formation de radicaux libres, ce qui constitue leur toxicité :

- le tétrachlorure de carbone CCl_4 par exemple, qui est utilisé comme solvant notamment pour le nettoyage à sec, peut s'il y a absorption cutanée accidentelle, se transformer au niveau des microsomes hépatiques (par oxydation sous l'action du cytochrome P450) en radical trichlorométhyl $\text{CCl}_3\cdot$ celui-ci va réagir avec l'oxygène pour former $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ qui induit une lipidoperoxydation hépatique intense responsable de l'hépatotoxicité du tétrachlorure de carbone ;

- un autre exemple est le paraquat, herbicide qui s'il y a ingestion accidentelle, va se concentrer surtout au niveau des poumons où il va libérer des radicaux libres (anions superoxyde et radicaux hydroxyles) par oxydo-réduction du cation paraquat-pyridinyl. La lipidoperoxydation radicalaire ainsi induite est responsable de la toxicité pulmonaire du paraquat qui entraîne congestion et oedème pulmonaire, puis fibrose et insuffisance respiratoire mortelle.

Des herbicides du type DIQUAT ou PARAQUAT peuvent fournir des $\text{O}_2\cdot^-$:

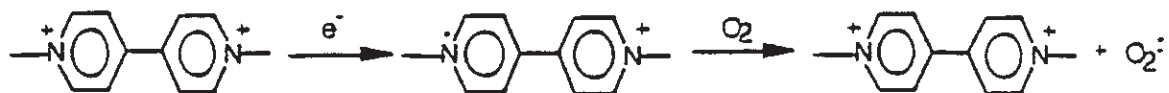


figure 7 : production de radicaux libres par le paraquat

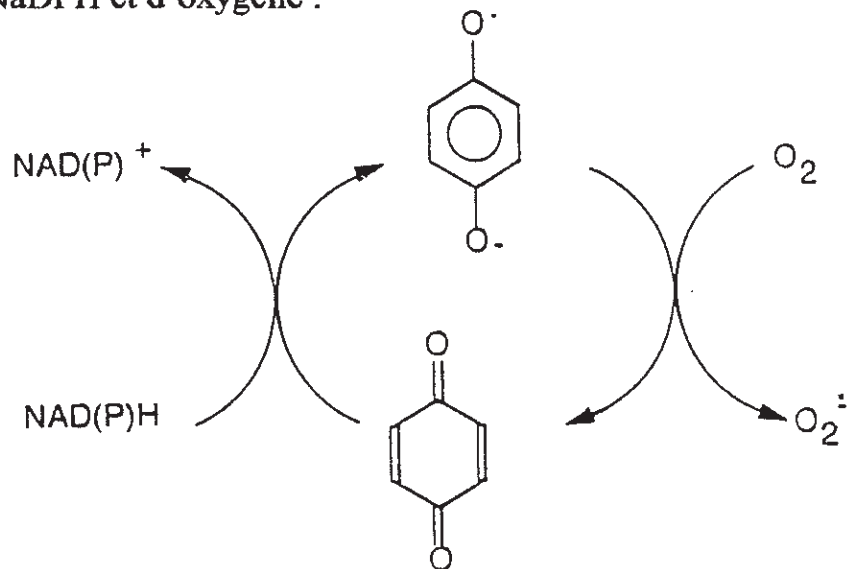
II-2 Toxicité médicamenteuse :

L'activation enzymatique de certains médicaments comme les anti-tumoraux produit des intermédiaires radicalaires qui sont à la base de leur effet thérapeutique, mais peuvent être aussi responsables d'effets toxiques.

Certains médicaments comme l'isoniazide et l'halothane ont une hépatotoxicité secondaire à la lipidoperoxydation des cellules hépatiques par les radicaux libres libérés au cours du métabolisme hépatique de ces médicaments.

D'autres comme la doxorubicine ont une cardiotoxicité secondaire à la lipidoperoxydation des cellules cardiaques par les radicaux libres libérés au cours de l'oxydo-réduction de la doxorubicine par les mitochondries cardiaques.

D'une façon générale, toutes les quinones peuvent donner l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, en présence de NADPH et d'oxygène :



III / POUVOIR PATHOGENE DES RADICAUX LIBRES :

Les systèmes physiologiques de défense peuvent être dépassés en cas de surproduction de radicaux libres.

Cette surproduction peut être due à une exposition à des rayonnements ultra-violet, à des états pathologiques, ou à des radiations ionisantes.

De plus, les systèmes enzymatiques de défense peuvent voir leur activité diminuée par suite d'un déficit ou par vieillissement.

L'attaque radicalaire s'exerce sur de multiples cibles biologiques, et particulièrement sur les acides nucléiques, certaines protéines, et les phospholipides membranaires (14), (17), (16), (5), (7), (13).

III-1 Mécanisme de l'agression radicalaire :

Sur une molécule biologique, un radical libre oxygéné va arracher un électron des orbitales externes des atomes constitutifs de cette molécule, ceci sous l'effet d'un champ électrique développé par l'électron célibataire du radical libre.

Ces deux électrons s'apparient, et le radical libre se trouve ainsi stabilisé.

Par contre, la molécule biologique agressée se retrouve avec un électron en moins sur ses orbitales externes, et elle devient à son tour un radical libre instable qui va chercher à se stabiliser selon le même processus.

Ceci entraîne une cascade de réactions en chaîne dont le résultat sera une altération des molécules biologiques agressées, altération aussi bien structurelle que physiologique.

Il en résulte une perturbation importante du métabolisme cellulaire.

III-2 Cibles biologiques :

III-2-1 Acides nucléiques.

A ce niveau, c'est l'acide désoxyribonucléique (ADN) qui subit l'agression des radicaux libres (18).

C'est essentiellement le radical superoxyde qui est responsable de cette agression en provoquant des cassures ou des mutations chromosomiques et en

induisant des échanges de chromatides soeurs, ceci par action au niveau des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN, provoquant ainsi la rupture de certains brins de cet ADN.

Les mutations sont dues au fait que les réparations de ces brins d'ADN peuvent se faire avec des erreurs.

Or l'ADN est un constituant essentiel de la matière vivante, il est porteur du code génétique de chaque individu, les radicaux libres peuvent entraîner une dénaturation de cet ADN, et par conséquent une modification de ce code génétique. Cette modification porte aussi bien la réplication ou la transmission de ce code que sur la synthèse des protéines.

III-2-2 Protéines :

Les protéines les plus touchées par les radicaux libres sont les protéines qui ont un groupement sulfhydrile (SH), ce qui est le cas de nombreuses enzymes cellulaires qui seront oxydées et inactivées.

Des acides aminés comme la cystéine voient leurs fonctions thiols oxydées, ce qui entraîne un retentissement au niveau de la peau et des phanères où la cystéine joue un rôle important.

Les protéines de structure comme les microfibrilles du collagène ou l'acide hyaluronique sont aussi agressées par les radicaux libres, ce qui entraîne une sclérose ou une fibrose du tissu conjonctif qu'elles constituent.

Certaines enzymes comme la cyclooxygénase ou la phospholipase A_2 peuvent être activées par les radicaux libres, ce qui entraîne une perturbation du métabolisme de l'acide arachidonique et des prostaglandines inflammatoires.

L'attaque radicalaire des protéines est donc responsable d'importants troubles métaboliques cellulaires.

III-2-3 Phospholipides membranaires : peroxydation lipidique

Les radicaux libres sont très actifs sur les lipides, ils entraînent le rancissement des graisses alimentaires par action sur les triglycérides, agissent sur l'acide arachidonique en donnant naissance à des peroxydes, mais leur cible essentielle est les acides gras insaturés des phospholipides membranaires.

L'oxydation de ces phospholipides membranaires entraîne une altération importante des membranes, une perte de composants intracellulaires, et la formation d'aldéhydes et de complexes lipoprotéiques (lipofuscine).

L'attaque des acides gras polyinsaturés par des radicaux superoxydes et hydroxyles forme des radicaux libres organiques qui sont instables.

III-2-3-1 Structure de la membrane cellulaire :

La membrane cellulaire est un système biologique élémentaire dont l'unité de base est un phospholipide, molécule disposant d'un pôle hydrophile et d'un pôle hydrophobe constitués de deux chaînes d'acides gras dites insaturées parce qu'elles possèdent plusieurs doubles liaisons carbone-carbone.

Cette membrane cellulaire est formée d'une double couche de phospholipides dont les pôles hydrophobes se font face, les pôles hydrophiles délimitant ainsi les surfaces interne et externe de la membrane.

Les protéines responsables des fonctions d'échange et de transmission d'information se trouvent au milieu de ce double feuillet.

La vulnérabilité de la membrane cellulaire se trouve au niveau des doubles liaisons des chaînes d'acides gras insaturés constitutifs de cette membrane.

III-2-3-2 Destruction membranaire :

L'attaque radicalaire des radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$ sur les membranes cellulaires phospholipidiques déclenche une réaction en chaîne due aux doubles liaisons carbone-carbone des acides gras insaturés.

Ces doubles liaisons facilitent la délocalisation de l'électron libre, et en présence d'oxygène moléculaire O_2 , il y aura appariement de l'un de ses électrons avec l'électron libre délocalisé, ce qui va potentialiser les dégâts primaires.

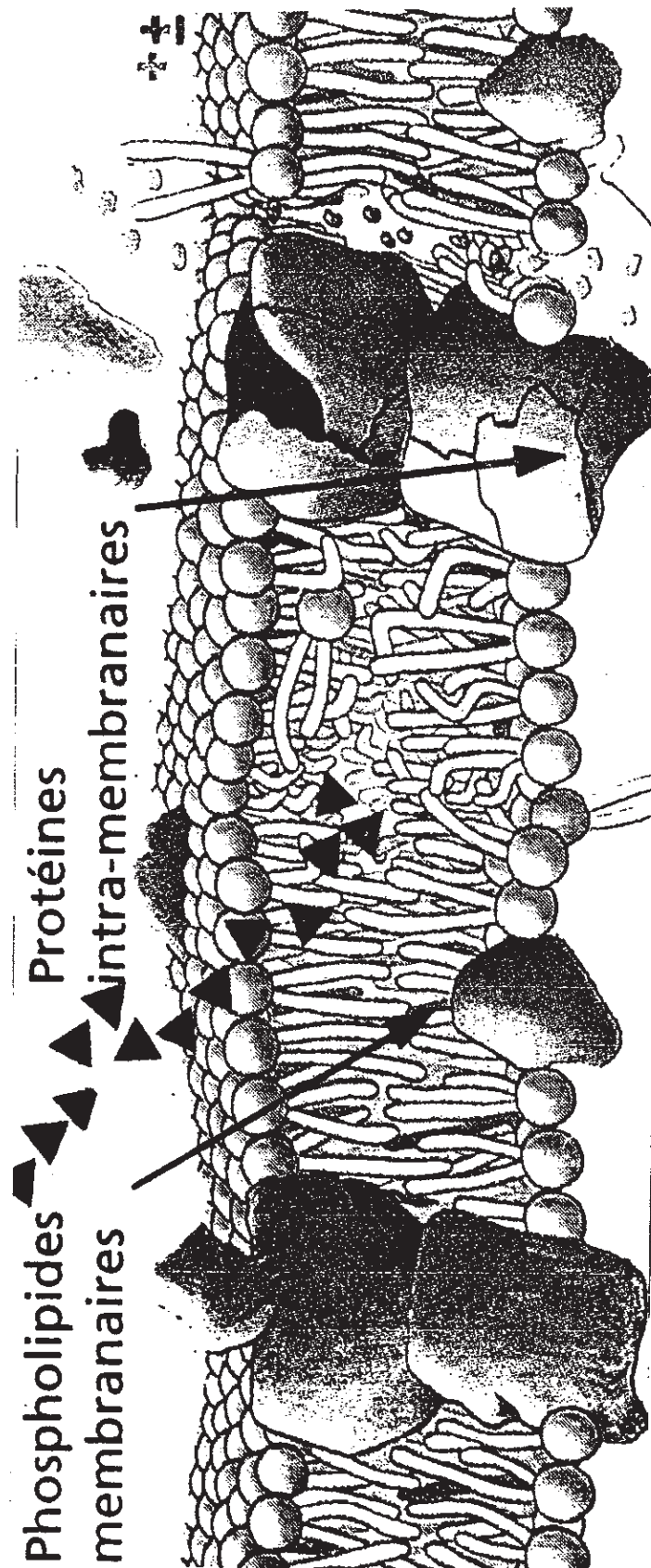


figure 8: Destruction de la membrane sous l'effet des radicaux libres (7).

La peroxydation lipidique est une réaction radicalaire qui comporte trois étapes :

- l'initiation,
- la propagation,
- la terminaison.

1/ L'INITIATION :

L'initiation de la réaction en chaîne se fait au niveau de la structure divynyl-méthane d'une double liaison d'un acide gras insaturé.



Le radical hydroxyle capte alors un atome d'hydrogène pour se stabiliser et se transforme en eau :



L'acide gras insaturé se transforme alors en radical libre et subit un réarrangement de ses doubles liaisons et, en présence d'oxygène, forme un radical peroxy $ROO\cdot$ qui est responsable de la propagation de la réaction :

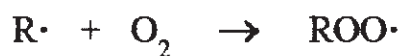


2/ LA PROPAGATION :

Le radical peroxy formé se transforme en un hydroperoxyde lipidique ROOH instable, ceci par arrachement d'un hydrogène sur une chaîne insaturée voisine intacte :



Le radical R· formé fixe une molécule d'oxygène et peut recommencer un nouveau cycle à son tour :



C'est cette réaction en chaîne qui constitue la lipidoperoxydation.

Les hydroperoxydes ROOH sont peu réactionnels mais en présence de fer Fe^{++} qui est un contaminant biologique universel, ils sont transformés par la réaction de FENTON en radicaux alcoxyles $\text{RO}\cdot$, ceux-ci sont capables de relancer une nouvelle chaîne comme pour les radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$.

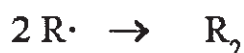


Les hydroperoxydes peuvent également être dégradés en alcanes ou en aldéhydes. Le dialdéhyde malonique est un des produits de dégradation formés et il peut réagir avec les groupements thiols (SH) ou amines (NH₂) des protéines, donnant naissance à des pigments fluorescents appelés lipofuscine, et dont l'accumulation caractérise les cellules siège de lipidoperoxydations intenses et répétées, ce qui est le cas lors du vieillissement cellulaire ou dans certaines pathologies (SIDA).

3/ LA TERMINAISON :

La réaction en chaîne s'arrête :

- lorsque deux radicaux libres, appartenant ou non à la même molécule, se réunissent, créant entre eux des ponts,



- lorsqu'un radical libre rencontre une molécule « piège » comme l'alpha-tocophérol membranaire,

- lorsque le dialdéhyde malonique réagit avec les protéines membranaires, établissant des pontages.

III-2-3-3 Conséquences de la peroxydation lipidique :

L'attaque radicalaire des acides gras insaturés et la lipidoperoxydation qui en résulte sont donc à l'origine d'une désorganisation importante de l'architecture membranaire. En effet, il y a des réarrangements des doubles liaisons carbone-carbone, des pontages intra et inter-moléculaires, et la membrane cellulaire perd sa souplesse et sa solidité avec, sur le plan fonctionnel, un retentissement sur ses fonctions de barrière et d'information :

- formation de brèches ioniques,
- troubles de la perméabilité,
- relations récepteurs-ligands perturbées.

A — Changement de la bicouche phospholipidique

Diminution de la fluidité
 Augmentation de la charge négative de surface
 Apparition d'une conductivité pour les protons
 Perte de la stabilité électrique et accroissement non spécifique de perméabilité.

B — Changement des membranes et des organites cellulaires

Inactivation des enzymes membranaires
 Oxydation des groupes thiol et accroissement de perméabilité
 Œdème et gonflement des mitochondries
 Découplage oxydation-phosphorylation
 Perte de cytochrome C et inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale
 Perturbation du système d'hydroxylation hépatique
 Décharge d'enzymes lysosomiales
 Activation des phospholipases membranaires

C — Changement dans le métabolisme et le comportement

Destruction des tocophérols, des thiols, des stéroïdes et de la thyroxine
 Redistribution des ions
 Inhibition de la motilité cellulaire et ralentissement de la division cellulaire.

figure 9 (13)

III-3 Radicaux libres et pathologie cardio-vasculaire :

Les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses pathologies de l'organisme (neuro-gériatrie, ophtalmologie, oncologie, pathologie digestive...), ils ont une influence considérable dans certaines pathologies cardio-vasculaires : (19), (20), (21), (5), (7), (12), (8)

- au cours de l'évolution du processus ischémique, une partie des altérations cellulaires pourrait résulter de la production de radicaux libres oxygénés ;

- au cours de la reperfusion du tissu ischémique qui exerce parfois des effets néfastes, accélère les phénomènes de nécrose et qui pourrait aussi être à l'origine d'une production importante de radicaux libres oxygénés du fait de la restauration du débit coronaire et de l'apport en oxygène qui en résulte ;

- dans les arythmies de reperfusion qui sont des phénomènes toxiques dus à la ré-oxygénation du tissu ischémique ;

- dans le déclenchement des mécanismes de l'athérome du fait de l'action des radicaux libres sur l'agrégation plaquettaire et de l'oxydation qu'ils réalisent sur les lipides infiltrant le sous endothélium.

III-3-1 Ischémie-reperfusion du myocarde :

Une des fonctions du tissu myocardique est l'oxydation de substrats exogènes apportés par la circulation coronaire, ce sont essentiellement le glucose, les acides gras libres, et le lactate.

Cette oxydation aboutit à la production d'énergie sous forme d'ATP qui sert à maintenir la fonction contractile, ainsi que les pompes membranaires assurant l'homéostasie ionique, et les systèmes cellulaires qui nécessitent de l'énergie.

Le tissu cardiaque consomme 10 % de l'oxygène total de l'organisme, et toute perturbation de l'apport en oxygène aura des conséquences métaboliques plus ou moins importantes sur les différents mécanismes nécessitant un apport énergétique.

Le déficit énergétique, les déviations métaboliques et l'infiltration leucocytaire qui résultent de l'ischémie, préparent l'agression radicalaire massive de la reperfusion.

En effet, en cas de diminution ou d'arrêt de la circulation artérielle au niveau d'un territoire localisé, on a diminution ou arrêt d'apport en oxygène, ceci constitue l'ischémie comme par exemple lors de l'infarctus du myocarde.

En phase d'ischémie, le rendement de la chaîne respiratoire mitochondriale sera médiocre (en anaérobie, deux molécules d'ATP sont produites à partir d'une molécule de glucose, contre 36 en aérobie), et l'hypoxie persistante induit une faillite énergétique de la pompe Na-K-ATPase membranaire avec intrusion de sodium et de calcium dans la cellule, augmentation de la pression osmotique et oedème intracellulaire.

Le calcium intracellulaire active la phospholipase A_2 (avec augmentation des acides gras libres), ainsi que l'enzyme qui convertit la xanthine-déshydrogénase en xanthine-oxydase source d'anions superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Parallèlement, le métabolisme de l'ADP en anaérobie se fait vers la synthèse d'AMP, d'adénosine, d'inosine, et d'hypoxanthine.

Toutes ces perturbations cellulaires sont encore réversibles, mais, au moment de la reperfusion, les cellules ischémiées vont être soumises à un stress oxydatif qui va accélérer leur destruction. En effet, la production radicalaire au cours de la reperfusion au niveau de la zone ischémiée est intense alors que les systèmes de protection sont déprimés (baisse importante des taux de superoxyde dismutase, catalase, et glutathion peroxydase au cours de l'ischémie).

Cette hyperproduction radicalaire peut être assurée par quatre voies :

- au cours de la respiration mitochondriale, par réduction monovalente de l'oxygène nouvellement disponible ;
- par activation des polynucléaires neutrophiles accumulés en zone d'ischémie (accélération de leur consommation d'oxygène et activation de la NADPH-oxydase membranaire) ;
- par réaction des produits du métabolisme en anaérobiose, à savoir hypoxanthine et xanthine oxydase, lesquels, en présence d'oxygène, forment la xanthine et l'anion superoxyde ;
- par transformation de l'acide arachidonique accumulé en phase ischémique, il y a synthèse d'endoperoxydes et production de radicaux libres.

III-3-2 Autres points d'impacts des radicaux libres :

III-3-2 -1 Nécrose myocardique :

L'ischémie myocardique, lorsqu'elle est sévère et prolongée, entraîne progressivement le développement d'un processus de nécrose dans la zone sous perfusée.

Les radicaux libres pourraient être impliqués dans ce processus, mais leur responsabilité reste discutée.

III-3-2 -2 Arythmies de reperfusion :

Des arythmies peuvent être observées au cours de la reperfusion du myocarde ischémié.

Les radicaux libres s'attaquent en effet aux membranes cellulaires et perturbent les pompes ioniques et la polarisation de la cellule, ce qui provoque des troubles du rythme.

Cependant, ce phénomène n'intervient que sur des cellules myocardiques dont l'atteinte est réversible, d'où l'importance de la durée de l'ischémie (une ischémie de faible durée de l'ordre de 15 min. entraîne un stress oxydatif qui joue expérimentalement un rôle indiscutable sur ces arythmies).

III-3-2 -3 Athérosclérose :

Les radicaux libres auraient un rôle important dans la lésion endothéliale qui initialise le processus athéromateux.

La cellule endothéliale va être en effet exposée à l'action des radicaux libres provenant des éléments sanguins, d'une synthèse par les macrophages et les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, ou enfin de sa propre activité.

III-3-2 -4 Hyperagrégation plaquettaire :

Les radicaux libres produits au cours du métabolisme l'acide arachidonique (synthèse des prostaglandines) favorisent secondairement la synthèse du thromboxane A_2 (TXA_2) en inhibant la cyclooxygénase.

Le TXA_2 est un agent chémoattractif vis à vis des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles.

III-3-2 -5 Vasospasme cérébral :

Les vasospasmes cérébraux, qui font souvent la gravité des hémorragies sous-arachnoïdiennes, sont secondaires à la présence d'hémoglobine (donc de fer) dans l'espace sous-arachnoïdien.

La production de radicaux libres qui en résulte induit une lipidoperoxydation en chaîne des acides gras membranaires avec augmentation des taux de 5-HETE, précurseur des leucotriènes, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Il y a épuisement progressif des systèmes de défense anti-radicalaire avec baisse rapide des taux de glutathion peroxydase et d'alpha-tocophérol dans le LCR, ce qui entraîne une activation plaquettaire avec libération de substances vasoconstrictrices.

Les lipidoperoxydations sont à l'origine de lésions de l'endothélium artériel, lesquelles stimulent l'agression plaquettaire et la libération de TXA_2 .

Cette libération de substances vasoconstrictrices et pro-agrégantes (TXA_2) provoque un spasme artériel « stable » dont les conséquences ischémiques dominant le pronostic neurologique (et vital) des hémorragies sous-arachnoïdiennes.

IV / SYSTEMES PHYSIOLOGIQUES DE DEFENSE FACE A LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES :

La production de radicaux libres oxygénés dans l'organisme est physiologique mais potentiellement dangereuse. Face à cela, l'organisme dispose de systèmes de défense spécifiques qui, présentes au niveau du lieu de production de ces radicaux libres, les maintiennent à de très faibles concentrations.

Ces systèmes de défense sont de deux catégories : (22)

- les systèmes de défense enzymatiques tels que la Superoxyde Dismutase (SOD), la Catalase, la Glutathion peroxydase,...
- les substances biologiques non enzymatiques ou piègeurs de radicaux libres tels que le glutathion, la vitamine E...

IV-1 Systèmes de défense enzymatiques :

Ils constituent la première ligne de défense face à la production de radicaux libres.

IV-1-1 La superoxyde dismutase : SOD

La SOD est une enzyme cytoplasmique et mitochondriale qui élimine l'anion superoxyde en accélérant sa vitesse de dismutation d'un facteur 10^3 à 10^9 , elle constitue le premier moyen naturel endogène à l'encontre des radicaux libres (14) :



La SOD est une métallo enzyme qui contient, selon les cas, du fer, du cuivre, du manganèse ou du zinc (11).

Trois sortes de SOD sont connues actuellement :

- les SOD type CU-Zn, que l'on retrouve au niveau du plasma et surtout au niveau des hématies ;
- les SOD à Mn, que l'on retrouve au niveau des mitochondries et des bactéries ;
- les SOD à Fe, que l'on retrouve au niveau du périplasma des bactéries.

Ces SOD ont un mode d'action similaire, le métal du site actif est oxydé ou réduit lors de sa rencontre avec l'anion superoxyde.

IV-1-2 Les enzymes de destruction des peroxydes :

L'organisme dispose de plusieurs moyens enzymatiques pour éliminer les radicaux peroxyde d'hydrogène.

IV-1-2-1 Les catalases :

Les catalases sont présentes au niveau d'un grand nombre de tissus, notamment au niveau du foie et des globules rouges. Leur localisation se situe à l'intérieur des peroxysomes, organites cellulaires qui jouent un rôle important dans la détoxification de divers produits (23).

Elles agissent en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire :



En détruisant le peroxyde d'hydrogène produit par les SOD, les catalases empêchent la production du radical hydroxyle par la réaction de FENTON.

IV-1-2-2 La glutathion peroxydase :

La glutathion peroxydase est aussi capable de détruire le peroxyde d'hydrogène en le transformant, en présence de glutathion réduit, en eau et en glutathion oxydé :



C'est une enzyme cytosolique et intramitochondriale à sélénium (23).

La glutathion peroxydase peut également limiter la propagation radicalaire en réduisant les hydroperoxydes ROOH instables en acides gras hydroxylés ROH :



Le rôle de cette enzyme est très important dans la plupart des tissus dans lesquels elle réalise la quasi totalité de l'élimination du peroxyde d'hydrogène, comme dans les globules rouges ou les plaquettes.

Il y a donc un effet complémentaire des SOD et des peroxydases dans la lutte contre les radicaux libres, les SOD éliminant l'anion superoxyde pour former le peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène, très cytotoxique surtout en présence de fer, étant ensuite pris en charge par la glutathion peroxydase pour poursuivre la transformation en molécule d'eau.

IV-2 Les piègeurs de radicaux libres :

Lorsque les systèmes de défense enzymatiques sont débordés, il y a accumulation d'ions superoxyde, de peroxyde d'hydrogène, et production de radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$ contre lesquels il n'existe aucun système enzymatique naturel de défense (24).

Des composés appelés « piègeurs de radicaux libres » sont cependant capables de ralentir considérablement les réactions d'oxydation en chaîne, elles constituent une deuxième ligne de défense.

Ce système de protection complémentaire est à la fois cytosolique (vitamine C, glutathion) et membranaire (vitamines A et E).

IV-2-1 L'alpha-tocophérol ou vitamine E :

La vitamine E joue un rôle anti-oxydant important en s'opposant à la lipidoperoxydation des membranes cellulaires en captant les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ à l'endroit même de leur formation (localisation membranaire de l'alpha-tocophérol).

Cette réaction donne un radical tocophérole plus stable et de faible réactivité (25).



Les hydroperoxydes ROOH formés seront dégradés par la glutathion peroxydase en dérivés hydroxylés non toxiques.

Le tocophérol est régénéré par la vitamine C.

IV-2-2 L'acide L-ascorbique ou vitamine C :

La vitamine C est un puissant agent réducteur , il réagit avec l'ion superoxyde, le radical hydroxyle, et avec tous les peroxydes et les radicaux tocophérols pour donner le radical délocalisé semidéhydroascorbate (24).

Elle peut aussi régénérer le tocophérol.

L'effet protecteur de la vitamine C vis à vis de la toxicité de l'oxygène est cependant discutée, celle-ci réalisant un système pro-oxydant très puissant en présence de cuivre ou de fer, donnant lieu à l'ion hydroxyle et au peroxyde d'hydrogène.

Son emploi en tant qu'antioxydant reste limité.

IV-2-3 Les caroténoïdes et la vitamine A :

Les caroténoïdes sont des provitamines qui sont apportées à l'organisme par l'alimentation végétale (abricots, carottes,...).

Le métabolisme des bêta-carotènes donne naissance à la vitamine A (rétinol) par l'action de la caroténase (26).

Les caroténoïdes et la vitamine A ont une activité antioxydante importante, ils piègent l'oxygène singulet dont ils utilisent l'énergie pour convertir la forme cis en son isomère trans, ils inactivent les radicaux libres et inhibent la lipidoperoxydation. Cette action se situe au niveau de la peau où ils sont photoprotecteurs.

IV-2-4 Le glutathion :

Le glutathion est un cofacteur d'un grand nombre d'enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, ascorbate réductase,...)

Il a aussi sa propre action protectrice :



Le radical $\text{GS}\cdot$ formé est moins réactif que $\text{OH}\cdot$, mais il n'est cependant pas inerte et pourra être réduit par la vitamine C.

FORMATION DES RADICAUX LIBRES OXYGÉNÉS ET SYSTÈMES NATURELS DE PROTECTION		
Oxydant	Mécanisme de formation	Système protecteur
O_2^- (anion superoxyde)	Enzymatiques : NADPH oxydase, réduction monoélectronique de O_2 , mitochondries, cytochrome P450, xanthine oxydase	Superoxyde dismutase
H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène)	Dismutation de O_2^- (spontanée ou par la SOD)	Catalase, Se-glutathion peroxydase (glutathion, réductase, G-6 PDG)
$\text{OH}\cdot$ (radical hydroxyle)	Radiolyse de l'eau par réaction de H_2O_2 et O_2^-	Acide urique, vitamine C, glutathion, taurine
$^1\text{O}_2$ (oxygène singulet)	Activation photochimique de O_2	Caroténoïdes
$\text{ROO}\cdot$ (radical peroxyde)	Formation contrôlée de $\text{ROO}\cdot$: activité des cyclo-oxygénases et lipoxygénases	Vitamine E (couplée à la vitamine C), ubiquinones
$\text{RO}\cdot$ (radical alcoyle)	Formation non contrôlée de $\text{RO}\cdot$ et $\text{ROO}\cdot$: secondaire à la production de O_2^-	
$\text{ROOH}\cdot$ (radical hydroperoxyde)	-	Se-glutathion peroxydase et glutathion

Figure 12 (5)

PARTIE EXPERIMENTALE

I/ METHODE D'ETUDE UTILISEE : LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE)

I-1 Définition :

La RPE, découverte en 1945 par Zavoïsky, est une technique spectroscopique qui permet d'étudier les molécules ou les ions possédant au moins un électron non apparié . Elle s'applique aux radicaux libres formés par rupture d'une liaison covalente, par arrachement ou addition d'un électron aux états triplets et aux ions de transition (27).

Cette technique consiste à mesurer l'absorption d'une onde électromagnétique traversant un échantillon soumis à un champ magnétique, en faisant appel à la variation de spin des particules, la sensibilité obtenue est considérable car on peut observer des radicaux libres à des concentrations de l'ordre de 10^{-8} mole.

On met ainsi en évidence les propriétés magnétiques des électrons célibataires, notamment ceux des radicaux libres induits par ionisation , qui sont le sujet de ce travail.

I-2 Principe :

Le spin correspond à un mouvement de rotation de l'électron sur lui-même. A ce spin est associé un nombre quantique m_s , nombre quantique de spin qui ne peut prendre que deux valeurs : $\pm 1/2$.

Ces deux valeurs correspondent à deux orientations possibles de l'axe de rotation de l'électron sur lui-même et ceci par rapport à la direction du champ magnétique qui est produit dans l'atome par les déplacements des électrons.

Un électron est caractérisé par sa masse, sa charge, son moment angulaire intrinsèque et son moment magnétique.

Le moment angulaire intrinsèque de l'électron est connu comme étant le vecteur de spin de norme S .

A l'électron libre correspond le moment magnétique : (28),(29)

$$\vec{\mu}_e = -\gamma_e \cdot \vec{S} = -g_e \cdot \beta_e \cdot \vec{S}$$

avec \vec{S} moment angulaire de spin ;

g_e facteur spectroscopique égal à 2,0023 ;

β_e magnéton de Bohr ($9,274 \cdot 10^{-24} \text{ A.m}^2$)

Le vecteur de spin de norme S représente le moment angulaire intrinsèque de l'électron.

On en déduit que le vecteur moment magnétique de l'électron est de sens opposé à celui du vecteur spin.

Quand un électron est placé dans un champ magnétique, son moment magnétique peut prendre deux orientations, celles-ci correspondent aux deux orientations possibles du vecteur de spin, parallèle et anti-parallèle au champ magnétique.

L'orientation possédant le maximum d'énergie est celle dans laquelle le moment magnétique est anti-parallèle.

Energie de l'électron dans un champ magnétique :

$$E = - \vec{\mu}_e \cdot \vec{H} \quad \Rightarrow \quad E = g_e \cdot \beta_e \cdot \vec{S} \cdot \vec{H}$$

avec \vec{H} champ magnétique ;
 $\vec{\mu}_e$ moment magnétique.

Le moment magnétique $\vec{\mu}_e$ peut prendre deux valeurs opposées, ce qui fait que selon son spin, l'électron peut prendre deux valeurs d'énergie E_1 et E_2 opposées mais égales en valeur absolue.

$$E_1 = \frac{1}{2} g_e \cdot \beta_e \cdot H \quad \text{ou} \quad E_2 = -\frac{1}{2} g_e \cdot \beta_e \cdot H$$

La mesure de la différence d'énergie ΔE est la base de la résonance paramagnétique électronique :

$$\Delta E = E_1 - E_2 = g_e \cdot \beta_e \cdot H$$

Lorsqu'on applique un champ de radiofréquence perpendiculairement au champ magnétique H , dont le quantum d'énergie $h\nu$ est égale à $g_e \cdot \beta_e \cdot H$, on induit une transition entre les deux états de l'électron.

La résonance ΔE est représentée par la coïncidence entre l'énergie apportée par l'onde et la différence énergétique entre les deux états de l'électron.

Il existe deux procédés pour faire apparaître la résonance :

- en gardant une valeur du champ magnétique fixe, on fait varier la valeur de l'onde électromagnétique ;
- en fixant une valeur pour la fréquence de l'onde, on fait varier le champ magnétique.

I-3 Appareillage :

L'appareil utilisé est de type BRUCKER ESP 300E, ses principaux composants sont : (27)

- un émetteur hyperfréquence, klystron, stabilisé sur la fréquence de résonance de la cavité résonante ;
- une cavité résonante contenant l'échantillon, placé dans la partie la plus homogène du champ magnétique ;
- un électro-aimant dont le champ peut varier de quelques G à plusieurs milliers de G ($1G = 10^{-4} T$) ;
- un amplificateur synchrone accordé sur la fréquence de modulation du champ magnétique, assuré par une bobine de Helmutz fixée à la cavité.

Le klystron est relié à la cavité par un pont hyperfréquence dont l'élément principal est un T magique séparant l'onde incidente de celle réfléchi par la

cavité qui est dirigée vers la diode détectrice du signal, connectée à l'amplificateur.

En l'absence de signal, la cavité est accordée de manière à réfléchir une fraction de l'onde incidente pour optimiser la réponse de la diode.

A la résonance, le taux de réflexion vers la diode augmente et le glissement en fréquence, qui se produit simultanément, est compensé par le contrôle automatique de fréquence du klystron.

Le signal est généralement enregistré sous forme de dérivée première, parfois de dérivée seconde d'absorption selon que l'on utilise une simple ou une double modulation du champ magnétique.

I-4 Méthodes d'analyse :

Deux méthodes sont utilisées pour analyser les radicaux libres en RPE, le « SPIN-TRAP » et le « SPIN-LABEL ».

I-4-1 Le « SPIN - TRAP » :

I-4-1-1 Principe :

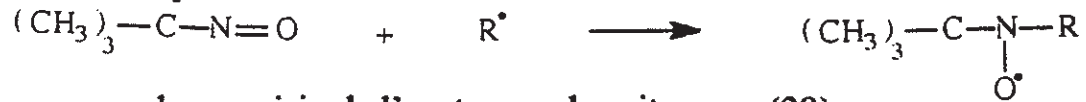
Cette méthode de détection des radicaux libres appelée spin trapping a été démontrée en 1960, et de nombreuses recherches ont été menées grâce à cette nouvelle technique, notamment les travaux de Perkins (30-31), Lagercrantz (32), Janzen (33-34-35), Finkelstein (36), et Kalyanaraman (37).

Le « spin-trap » est capable de capter les radicaux libres oxygénés de durée de vie très courte (10^{-19} à 10^{-10}) pour former des radicaux de durée de vie supérieure, les « spin-adducts » qui sont détectables par la RPE (38).

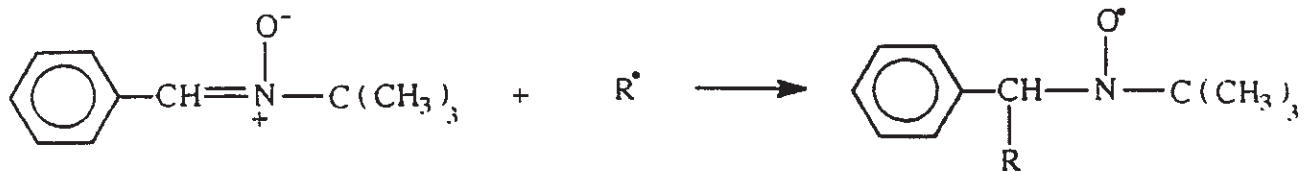
Les spin-traps les plus utilisés sont des composés nitrones et nitroso qui donnent des nitroxides comme spin-adducts.

Le radical libre oxygéné se fixera :

- sur l'azote pour les nitroso :



- sur un carbone voisin de l'azote pour les nitrones : (39)



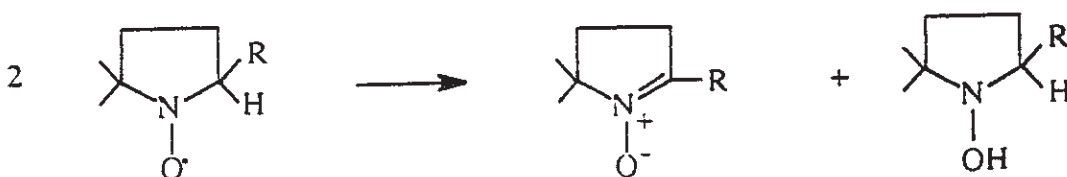
Le spin-trap et le spin-adduct doivent être solubles dans les milieux étudiés, et la diffusion du spin-trap vers les radicaux libres possible.

Lorsqu'un radical a été capté dans la solution examinée, on a une détection du spectre R.P.E. du nitroxyde spin-adduct.

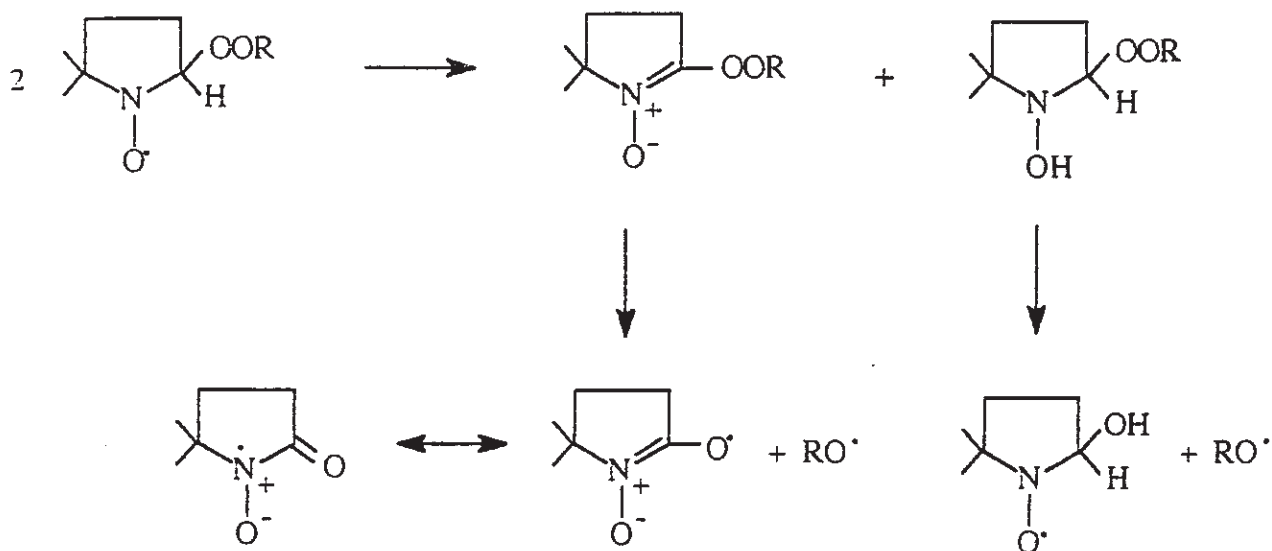
La réaction de spin trapping doit être plus rapide que les autres réactions du radical pour un bon rendement dans la formation de spin-adducts, et le spin-trap idéal doit donner un spin-adduct parfaitement stable et neutre face aux autres réactifs du milieu, même face aux radicaux libres. Ces conditions sont rarement rencontrées, mais la technique est au point.

La force du signal R.P.E. est directement proportionnelle au nombre de radicaux libres produits, ainsi la méthode du spin-trapping peut être un outil quantitatif, permettant de compter le nombre de réactions radicalaires dans le système étudié.

Cependant, les spin-adducts peuvent être fortement réactifs et sont susceptibles de se décomposer en hydroxylamine et en une nouvelle nitronne, les pourcentages de cette décomposition sont particulièrement élevés pour les spin-adducts de nitrones cycliques tel que le 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) : (40),(41)



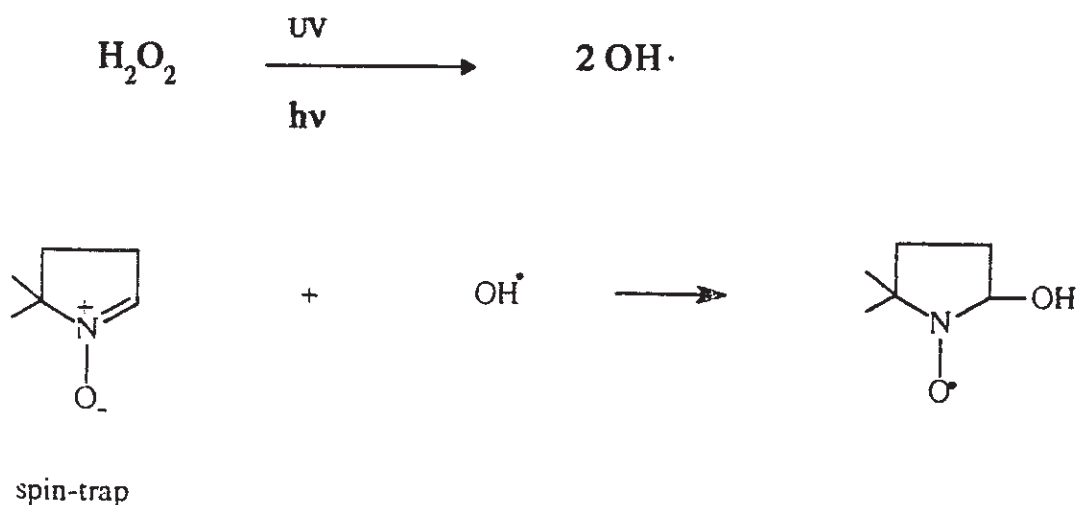
La nouvelle nitrone peut alors capter des radicaux libres pour donner des spins-adducts plus stables, et l'hydroxylamine est capable d'induire la décomposition des peroxydes (42).



I-4-1-2 Protocole expérimental :

Le protocole expérimental le plus couramment retenu utilise le DMPO comme spin-trap.

Le DMPO réagit avec les radicaux hydroxyles OH^\bullet produits par photolyse du peroxyde d'hydrogène : (43)



Les conditions optimales de réalisation du spectre de spin-adduct dépendent :

- du temps d'irradiation par les UV,
- du temps d'acquisition du spectre après irradiation, fonction de la durée de stabilité du spin-adduct formé.

Conditions opératoires :

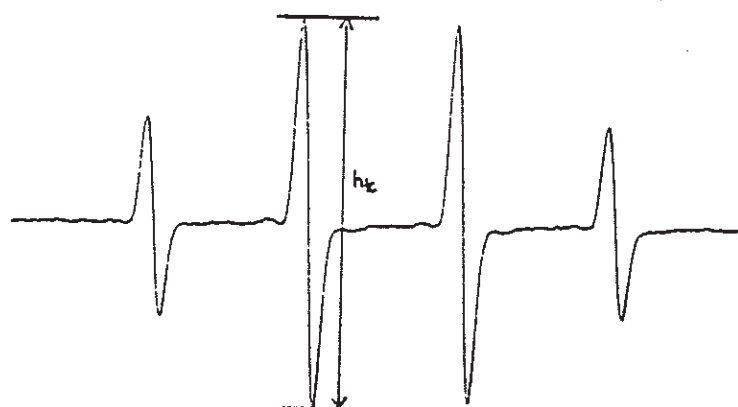
- peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 30 volumes (10 μ l),
- DMPO pure (5 μ l),
- tampon phosphate pH = 7 ou du produit testé en solution dans le même tampon (85 μ l).

Le temps d'irradiation UV est de 4 mn sous une lampe de 100W Bioblock à 254 nm.

L'acquisition du spectre se fait 3 mn après l'irradiation UV.

La quantité de radicaux libres formés étant constante pour un temps d'irradiation donné, il y a une compétition entre l'avidité de la DMPO et du produit testé vis à vis des radicaux $OH\cdot$ formés dans le milieu réactionnel.

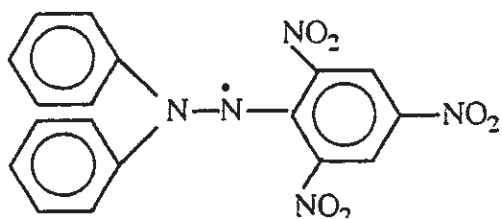
Le spectre obtenu montre la présence de quatre pics caractéristiques du spin-adduct de la DMPO. Les mesures sont faites sur la valeur de l'amplitude (ht) d'un des pics centraux. A partir de la variation d'amplitude de ce pic, nous pourrions déterminer le pourcentage d'inhibition des radicaux libres formés à partir du peroxyde d'hydrogène (cf. spectre ci-dessous).



I-4-2 Le « SPIN - LABEL » :

I-4-2-1 Principe :

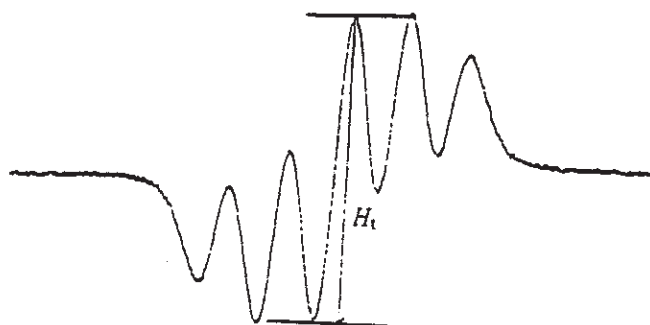
Cette méthode de détection des radicaux libres repose sur la stabilité de certains radicaux libres, comme la 1,1-diphényl 2-picryl-hydrazyl (DPPH).



La DPPH est une molécule radicalaire qui possède la particularité d'être stable sur plusieurs jours (44), (45).

Une solution éthanolique de DPPH, placée dans la cavité de mesure de la RPE, donne un signal considéré comme le signal de référence. On détermine ainsi l'amplitude de référence (H_t).

L'amplitude du signal est directement proportionnelle au nombre de radicaux libres présents dans la cuve de mesure :



Pour savoir si une molécule X a un pouvoir antiradicalaire (pouvoir Scavenger), une gamme de dilution de cette molécule est réalisée en solution éthanolique. Chaque dilution est ajoutée, en quantité équivalente, à la solution de DPPH pour réaliser l'enregistrement des différents signaux.

Si cette molécule a un pouvoir Scavenger, elle capte l'électron radicalaire sans pour autant devenir radicalaire, d'où une diminution du nombre de radicaux libres entraînant une baisse mesurable de l'amplitude.

Cette méthode permet donc de comparer l'activité antiradicalaire de différentes molécules par l'intermédiaire du signal de référence, ainsi que de déterminer la concentration inhibitrice de 50 % (CI₅₀), la comparaison de plusieurs molécules à pouvoir scavenger est ainsi possible.

I-4-2-2 Protocole expérimental :

Dans ce protocole, le spin-label est la DPPH.

- préparation d'une solution éthanolique de 10 ml de DPPH 10⁻³ M,
- préparation d'une solution éthanolique de 10 ml du produit à tester (de l'ordre de 0,2g pour 10 ml),
- faire le spectre du DPPH seul en solution éthanolique :
dans un tube, mettre 100 µl de DPPH + 100 µl d'éthanol pur,
mettre au vortex 10 secondes,
mettre le mélange dans une pipette pasteur, faire la lecture.
- pour tester le produit ; refaire les mêmes conditions opératoires en remplaçant l'éthanol pur par les solutions éthanoliques du composé :

100 µl de DPPH + 100 µl de produit

- faire la lecture.

Il faut recalibrer après chaque changement d'échantillon.

on détermine pour chaque signal l'amplitude maximum (Hx), et si Ht est l'amplitude témoin (DPPH), le pourcentage d'inhibition I du radical DPPH est :

$$I = \frac{Hx}{Ht} \cdot 100$$

L'activité antiradicalaire est AAR = 100 - I, et on détermine graphiquement la CI50.

II/ THIOALKYLATION PAR CATALYSE PAR TRANSFERT DE PHASE :

Pour évaluer l'activité antiradicalaire du captopril, nous allons le méthyler, puis étudier cette activité en comparant le pouvoir anti-radicalaire du captopril et du captopril méthylé sur sa fonction thiol dont nous voulons déterminer l'impact sur la production de radicaux libres.

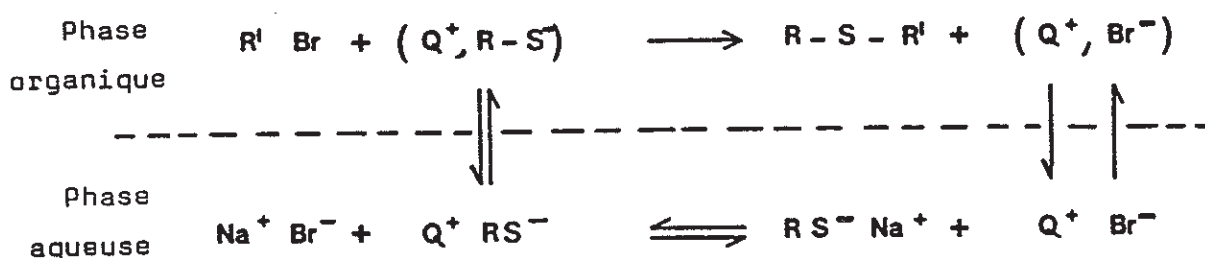
Nous allons donc commencer par méthyler le captopril sur sa fonction thiol, cette méthylation est une catalyse par transfert de phase (CTP) (46).

II-1 Principe de la CTP :

La CTP concerne en général des réactions entre un sel dissous dans l'eau (ou à l'état solide) et un substrat dissous dans un solvant organique, en présence d'un catalyseur(47), (48). Si le substrat est liquide, il peut jouer à la fois le rôle de réactif et de solvant (49), (50) ; dans tous les cas, le système sera biphasique.

L'obtention d'un sulfure d'alkyle par CTP résulte de la réaction entre un thiolate alcalin RS^- dissous dans la phase aqueuse et un bromure d'alkyle $R'BR$ constituant lui-même la phase organique, le catalyseur étant QBr (figure 11)

Figure 11 : Mécanisme réactionnel de la synthèse d'un sulfure d'alkyle par CTP grâce à un cation Q^+ ammonium ou phosphonium (Q^+ , Br^-) une paire d'ions intimes).



II-2 Mécanisme réactionnel :

La réaction décrite figure 1 permet de distinguer quatres étapes :

- étape 1 :

Il s'agit d'un partage de $Q^+ RS^-$ entre la phase aqueuse et la phase organique, il y a tranfert équilibré de l'anion thiolate RS^- de la phase aqueuse vers la phase organique grâce au cation Q^+ . Ce transfert dans la phase organique n'est possible que si la paire d'ions $Q^+ RS^-$ à un caractère lipophile supérieur à son caractère hydrophile, c'est pour cela qu'il faut utiliser un cation Q^+ de type ammonium porteur d'une longue chaîne hydrocarbonée qui servira de catalyseur de la réaction.

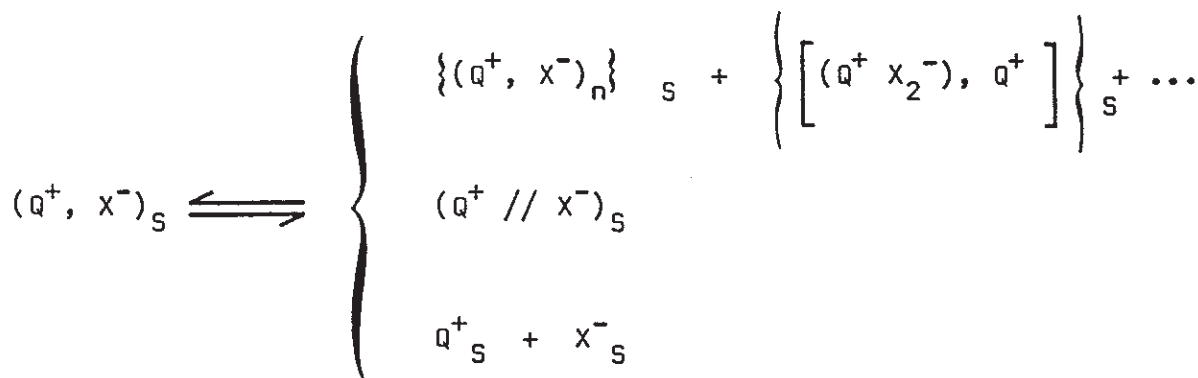
Cette étape correspond en fait à une extraction de paire d'ions (51).

- étape 2 :

Il s'agit de la réaction entre l'anion thiolate RS^- transféré dans la phase organique et l'halogénure d'alkyle constituant cette phase organique.

Il est essentiel dans cette étape que le thiolate est un réactivité suffisante, cette réactivité sera d'autant plus importante que le thiolate subira moins d'interactions de la part du solvant ou de cations associés.

Le problème ici est celui de la réactivité maximale de l'anion thiolate RS^- en milieu organique.



Cette étape est complexe et pratiquement impossible à traiter quantitativement, il faudra cependant se contenter en première approximation de l'équilibre :



X^- étant l'anion thiolate RS^-

- étape 3 :

Il s'agit, comme pour la première étape, d'un transfert d'ion d'une phase dans l'autre.

Il y a transfert équilibré de l'anion bromure Br^- vers la phase aqueuse grâce à au cation Q^+ : après la condensation dans la phase organique, un sel (Q^+, Br^-) est formé et doit être transféré dans la phase aqueuse.

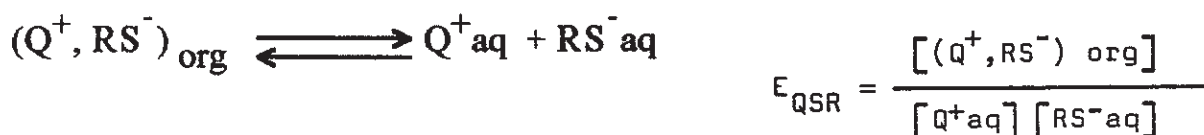
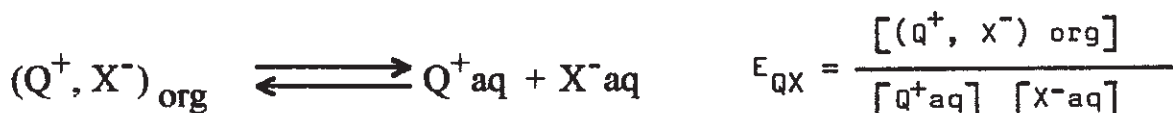
- étape 4 :

Il y a échange ionique en phase aqueuse qui conduit à la régénération du réactif $Q^+ RS^-$

L'équilibre de cette étape dépendra essentiellement de la nature de l'anion halogénure et de la structure du cation Q^+ , ceux-ci seront choisis en conséquence.

II-3 Equations théoriques :

L'ensemble du mécanisme réactionnel repose sur l'extraction des ions d'une phase par l'autre, et on peut en principe calculer les valeurs des constantes théoriques d'extraction correspondant aux deux équations : (52)



Il ne faut cependant pas oublier que ces équations décrivent le cas idéal où les coefficients d'activité seraient égaux à 1 et où il n'existerait pas de réactions parasites.

Dans ce cas, la comparaison des valeurs de E_{QX} et E_{QSR} permettrait de savoir si l'extraction de l'anion thiolate RS^- dans la phase organique serait compétitive par rapport à celle de l'halogénure X^- .

II-4 Cinétique :

La cinétique des réactions par CTP étant complexe, elle sera abordée ici de façon succincte.

Les cinétiques des réactions étudiées sont essentiellement des cinétiques de réactions de substitution pour lesquelles les échanges d'anions et les

transferts sont rapides, la réaction lente est alors la substitution en phase organique.

La vitesse d'une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire du type : (53)



est représentée par l'équation :

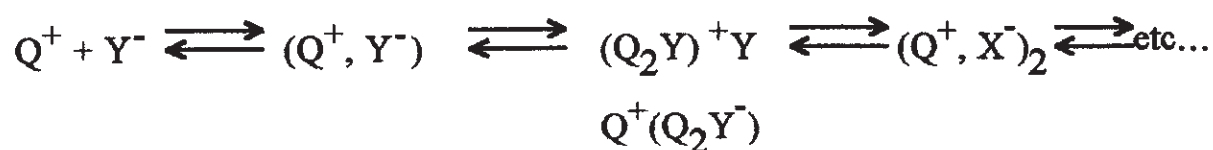
$$v = k [Y^-] [R-X]$$

Elle devrait donc être proportionnelle à la concentration en ions libres Y^- (RS^- pour la réaction) et de ce fait dépendre de la position de l'équilibre d'ionisation :



La réalité est en fait plus complexe : la cinétique d'une substitution nucléophile bimoléculaire est fonction de l'énergie d'interaction anion-cation et ne correspond pas à ce que l'on pourrait prévoir en fonction de la simple valeur de la constante d'ionisation K_i de la paire d'ions.

Cette cinétique est encore compliquée par l'existence d'équilibres d'agrégation du type :



Pour simplifier le problème, on peut considérer que les trois paramètres essentiels pouvant influencer sur la cinétique seraient :

- la nature et la vitesse de la réaction en phase organique,
- la structure, la concentration et la solubilité en phase organique du catalyseur,
- enfin l'équilibre du transfert d'anion de la phase aqueuse vers la phase organique et le mécanisme de ce transfert.

Si le troisième paramètre est maintenu constant en gardant la phase aqueuse saturée en X^- et Y^- (faible volume d'eau, solution aqueuse saturée en thiolate alcalin et en NaBr), les réactions suivent alors des cinétiques d'ordre 1 : la constante de vitesse apparente K_{app} varie alors proportionnellement à la quantité de catalyseur Q_{org} utilisée :

$$K_{app} = f(Q_{org})$$

Mais généralement, la concentration en anions n'est pas constante et la cinétique est d'ordre 2. Pour définir les conditions optimales d'une réaction donnée, on essaiera d'évaluer qualitativement et de façon semi-empirique les paramètres importants et le sens dans lequel il faudra les faire évoluer pour obtenir un résultat convenable.

III / RESULTATS :

III-1 Méthylation du captopril:

III-1-1 Conditions opératoires:

A 54 ml de benzène on ajoute 6 ml de NaOH solution (40 g NaOH dans 100 ml d'eau distillée) contenant : (54)

- 4,34 g de captopril (0,02 mole),
- 0,4 g de tétrabutylammonium bromide.

A ces 60 ml de mélange, on rajoute 1,8 ml de CH_3I (iodure de méthyle), ceci se faisant goutte à goutte et à froid.

Une fois cette opération terminée, on met le reflux, et on compte 6 heures de réaction à partir de 60°C .

On obtient deux phases :

- une phase benzénique translucide (phase organique),
- une phase sodique jaune ocracée (phase aqueuse).

La phase organique étant la plus importante, et se trouvant au dessus de la phase aqueuse.

On sépare ensuite les deux phases, le captopril méthylé se trouvant normalement dans la phase organique.

On effectue enfin une évaporation à sec de la phase benzénique pour obtenir le résidu de captopril méthylé.

On obtient un produit solide.

Il est à noter que le rendement de cette réaction est faible. De plus, on a remarqué qu'au bout de 24 heures, un produit avait cristallisé à froid dans la phase aqueuse, ce qui laissait à penser qu'on avait aussi du produit méthylé dans cette phase, à moins que ce ne fut le captopril qui n'avait pas réagit.

En fait, il semblerait bien que ce soit le produit méthylé qui se trouvait dans les deux phases aqueuse et organiques, nous en avons eu la démonstration avec les différents essais effectués sur ces produits que nous avons nommés :

- produit A : produit ayant cristallisé dans la phase aqueuse,
- produit B : produit ayant cristallisé dans la phase organique.

III-1-2 Essais de solubilité:

La solubilité des produit A et B de synthèse obtenus a été testée avec plusieurs solvants, et ceci pour les purifier :

- solubilité dans l'éther : peu soluble,
- solubilité dans l'éthanol : soluble,
- solubilité dans l'eau distillée : soluble.

Les solubilités sont identiques pour les produits A et B.

III-1-3 Points de fusion :

- Captopril : 105°C.
- Produit A : 135°C.
- Produit B : 134°C.

Les produits A et B ont un point de fusion sensiblement identique, différent de celui du captopril.

III-1-4 Spectres UV-Visible :

Les spectres du captopril, et des produits A et B ont été effectués avec les solutions mères suivantes :

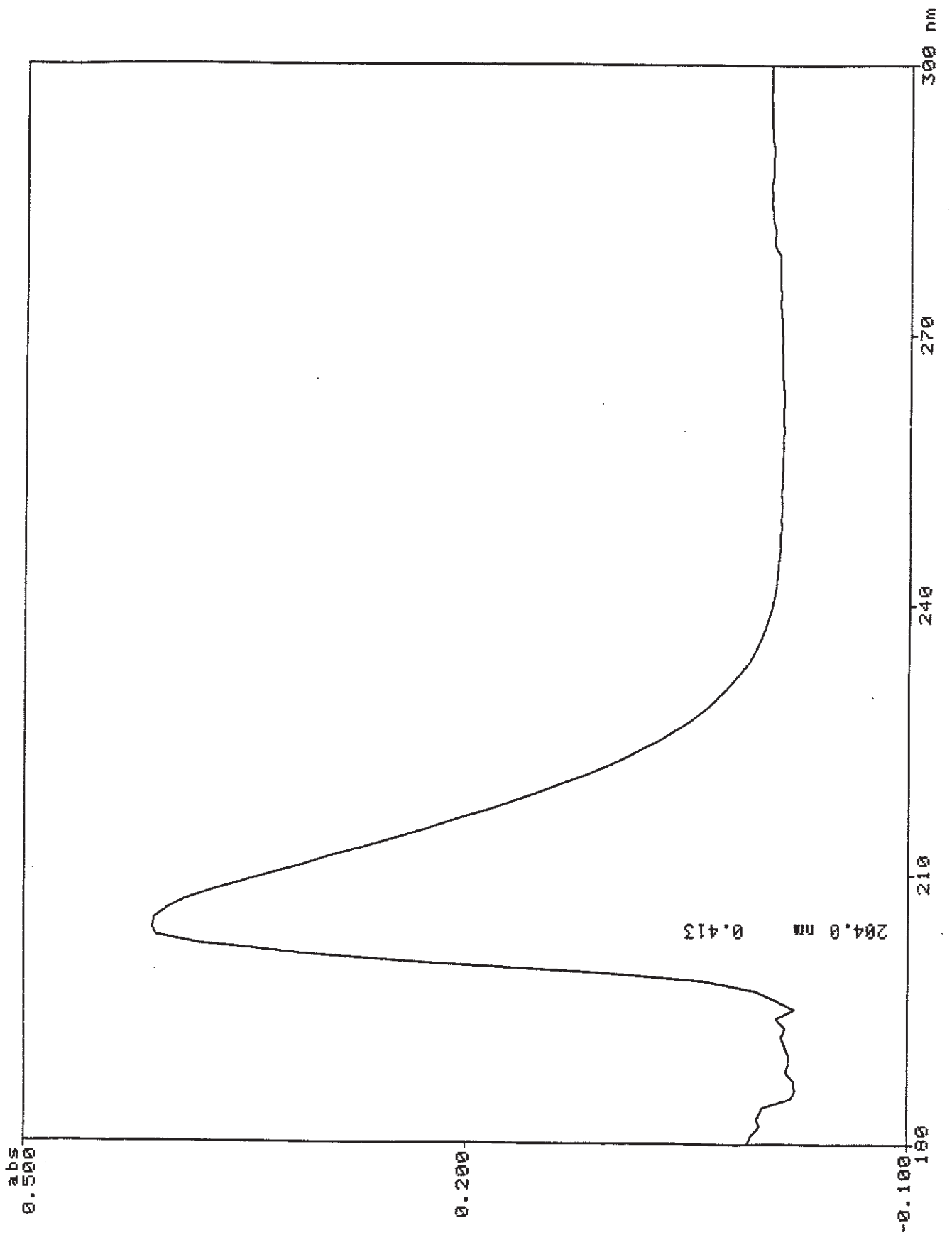
- captopril : 25 mg de captopril dans 10 ml d'éthanol, soit une concentration $[c] = 11,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$,
- produit A : 10 mg de produit A dans 20 ml d'éthanol,
- produit B : 10 mg de produit B dans 20 ml d'éthanol.

On utilise comme référence l'éthanol, et on fait des dilutions pour que la loi de Beer-Lambert soit vérifiée ($DO < 1$) :

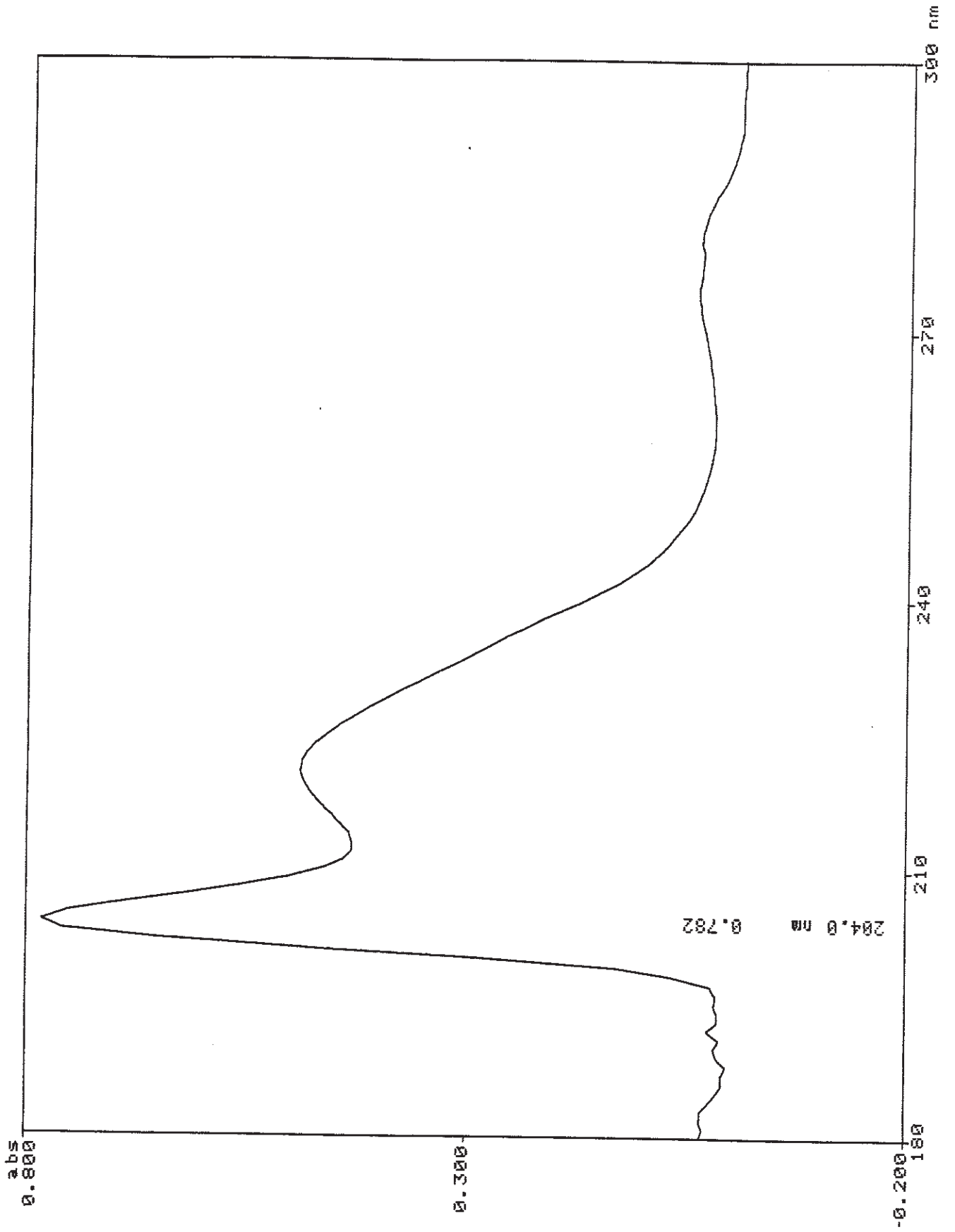
- captopril : dilution au 1/100e,
- produit A : dilution au 1/100e,
- produit B : dilution au 1/100e.

On obtient un pic unique à 204 nm, ce qui nous permet de dire que le cycle du captopril a été respecté par la synthèse.

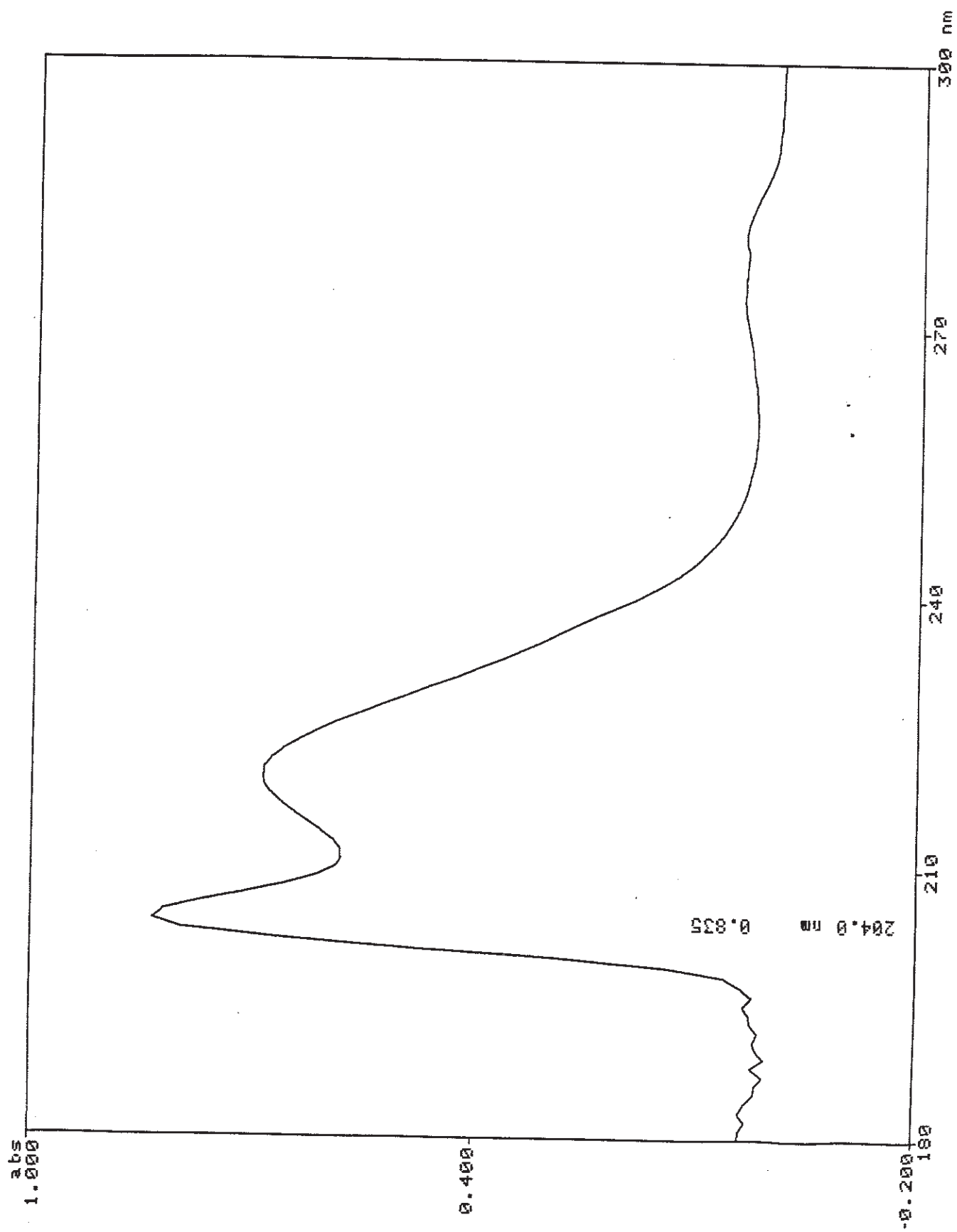
(cf. Spectres 1, 2, 3).



Spectre n°1 : Spectre UV-Visible du Captopril.



Spectre n°2 : Spectre UV-Visible produit A



Spectre n°3 : Spectre UV-Visible produit B

III-1-5 Spectres Infra-Rouge :

Nous avons réalisé les spectres infra-rouge (IR) du captopril, et des produits A et B :

Pour le captopril on retrouve les vibrations :

- de la fonction -OH à 3500 cm^{-1} .
- de la fonction -SH à 2999 cm^{-1} et 2575 cm^{-1} .
- de la fonction cétone C=O à 1749 cm^{-1} .
- de la fonction -COO⁻ à 1595 cm^{-1} .

Pour les produits A et B, on retrouve la vibration de la fonction cétone C=O à 1767 cm^{-1} , les spectres étant identiques.

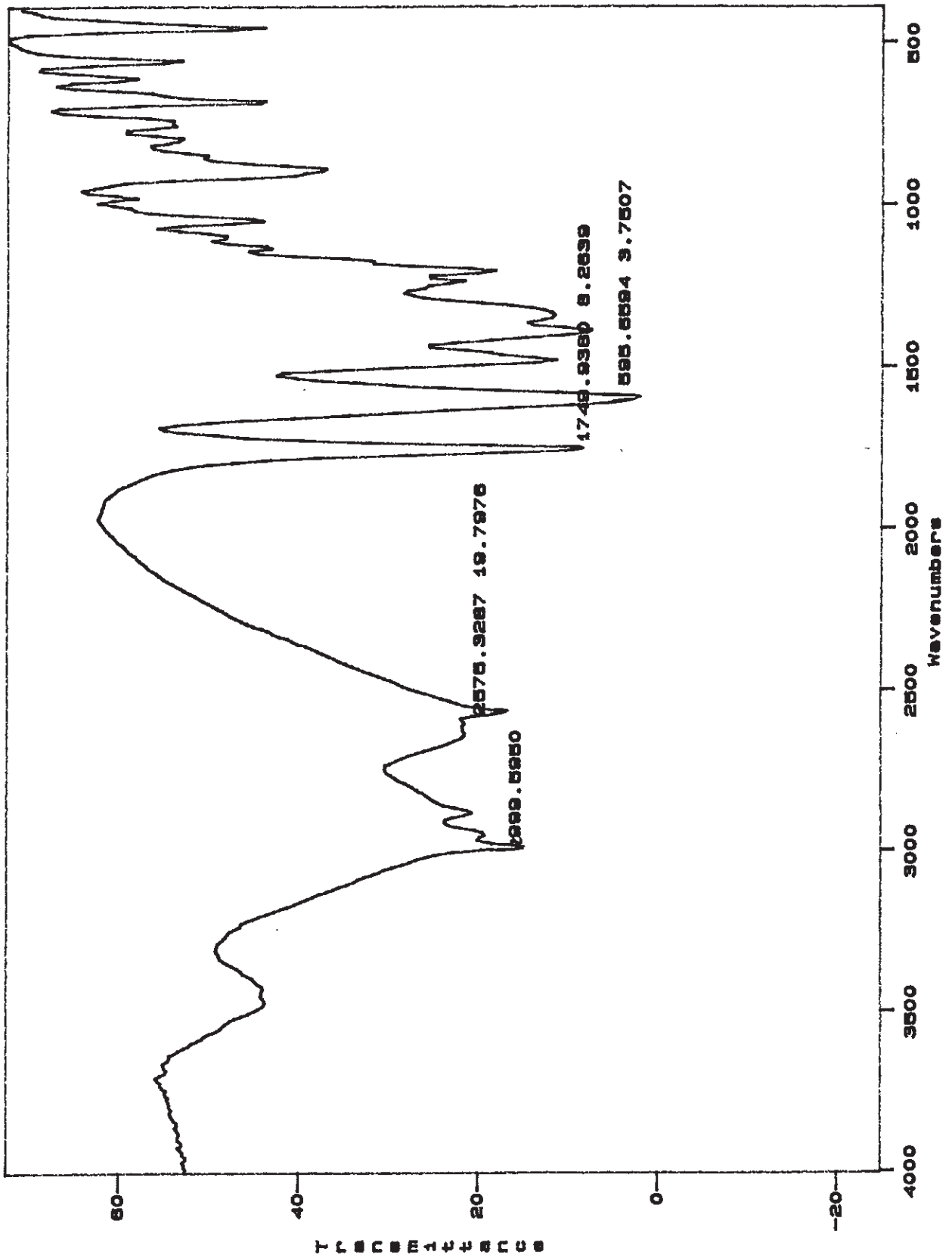
(cf. spectres 4,5 6).

III-1-6 Spectres RMN :

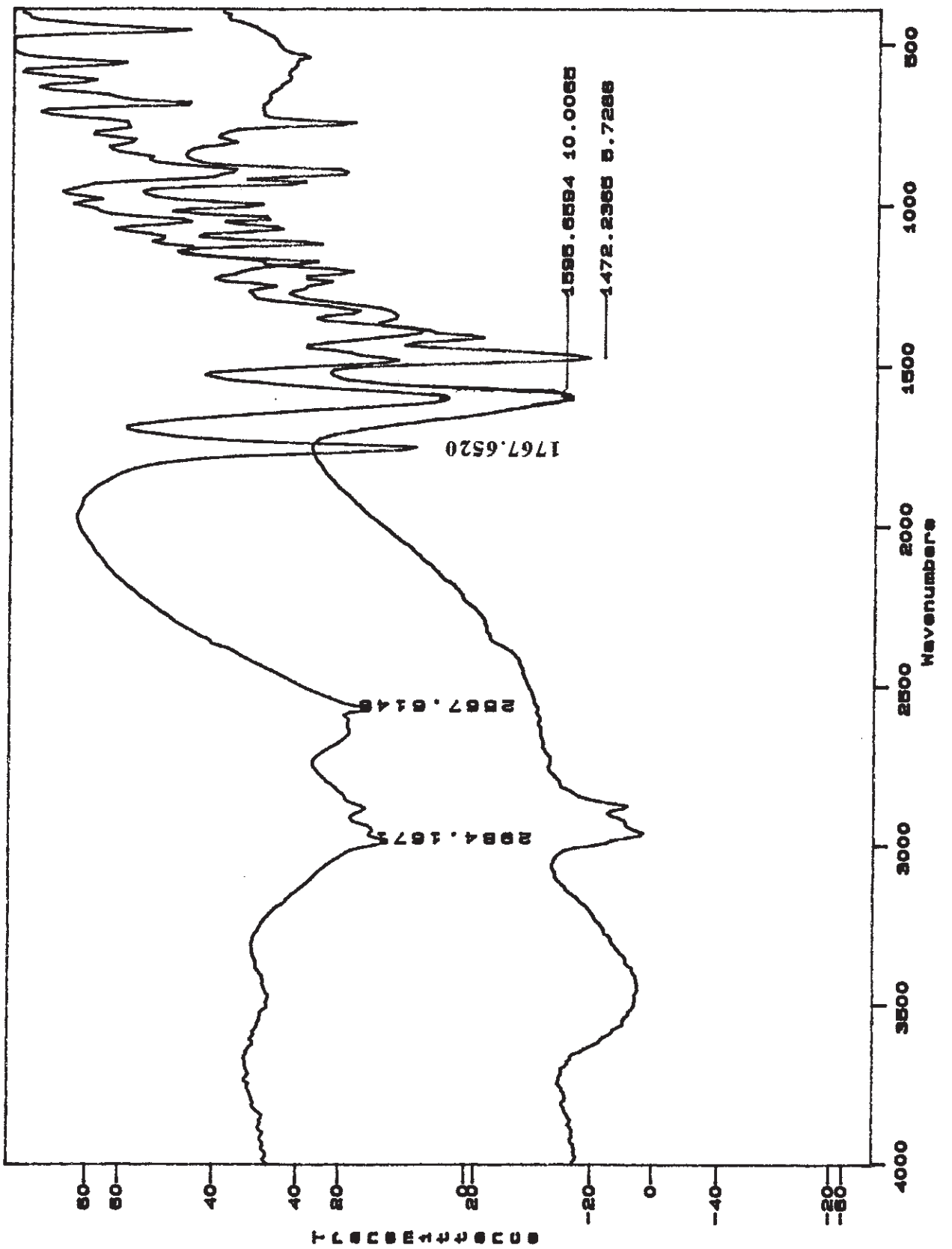
Nous avons effectué les spectres RMN ¹H du captopril et du produit B,, on retrouve l'hydrogène de la fonction thiol du captopril à 11 ppm sur le spectre du captopril, cet hydrogène est remplacé par les trois autres de la fonction méthyl sur la fonction thiol sur le spectre du produit A et on les retrouve à 3 ppm environ. Les autres vibrations sont communes aux deux produits :

- $\delta = 2,1$ ppm, doublet, 2H, -CH₂-SCH₃,
- $\delta = 2,8$ ppm, multiplet, 1H, -CH-CH₃,
- $\delta = 1,1$ ppm, doublet, 3H, -CH-CH₃,
- $\delta = 4,6$ ppm, triplet, 2H, -N-CH₂,
- $\delta = 2$ ppm, multiplet, 4H, -CH₂-CH₂-
- $\delta = 2$ ppm, doublet, 2H, -CH₂-N-

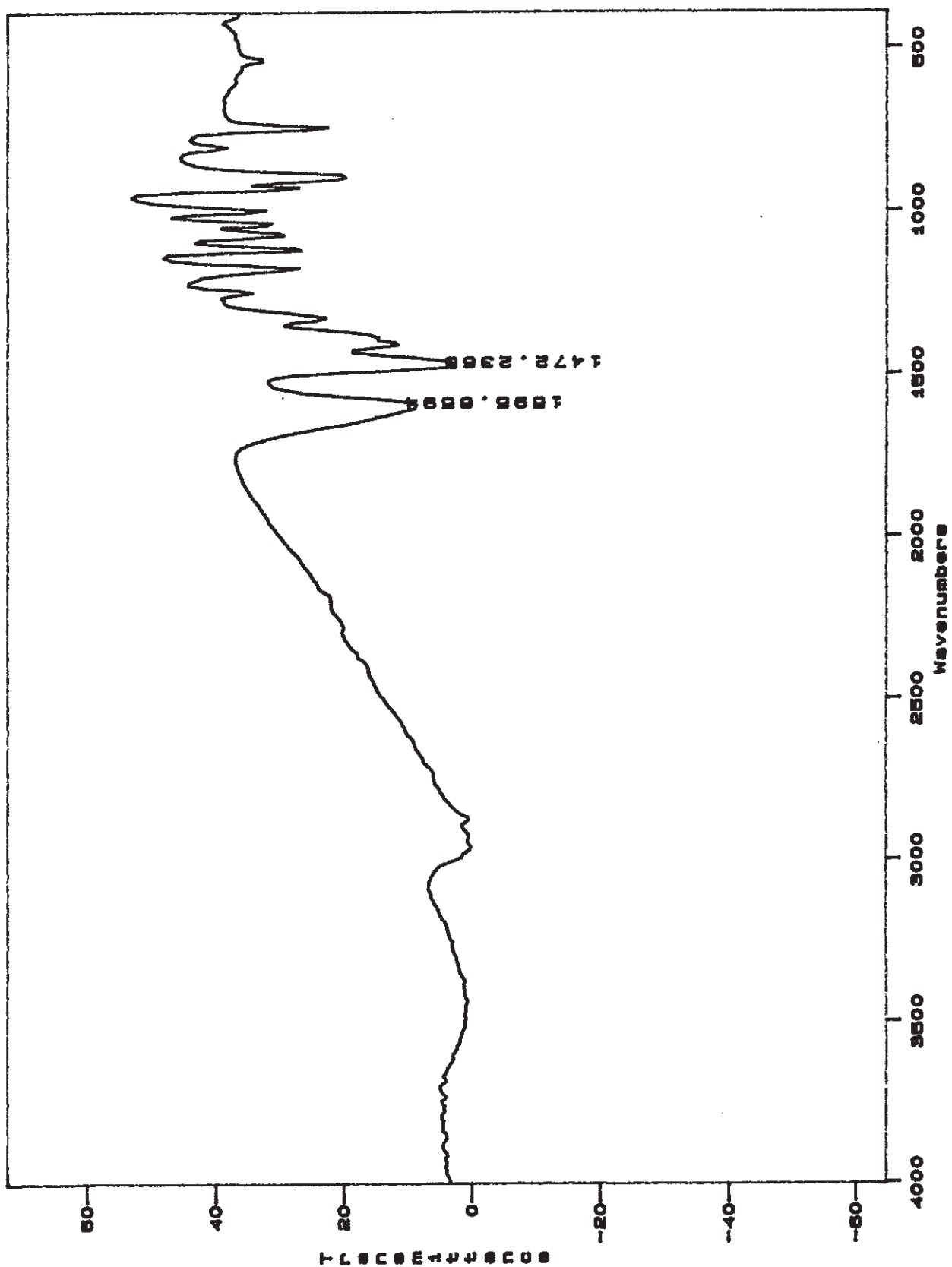
(cf. spectres 7 et 8).



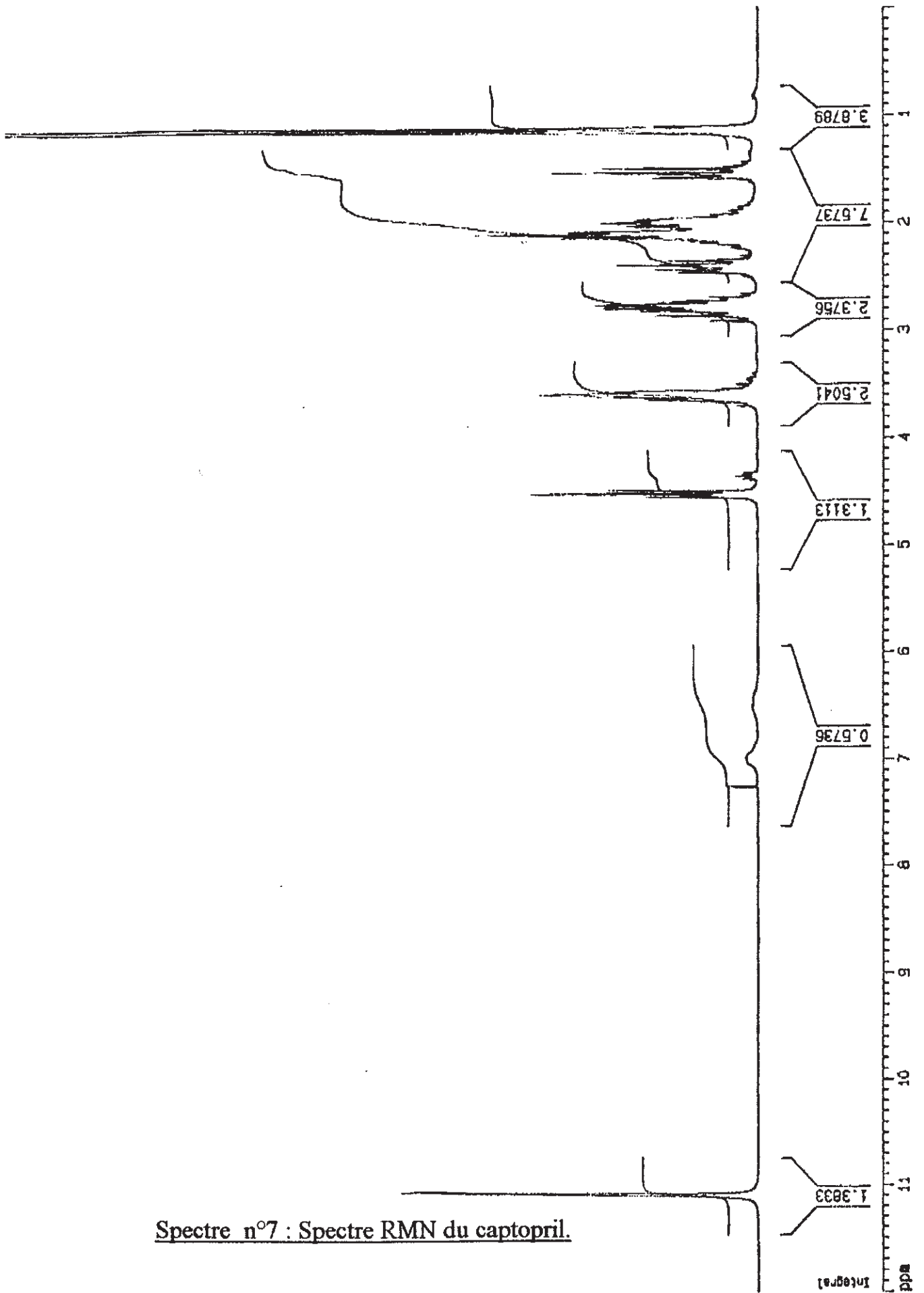
Spectre n°4 : Spectre IR du captopril.



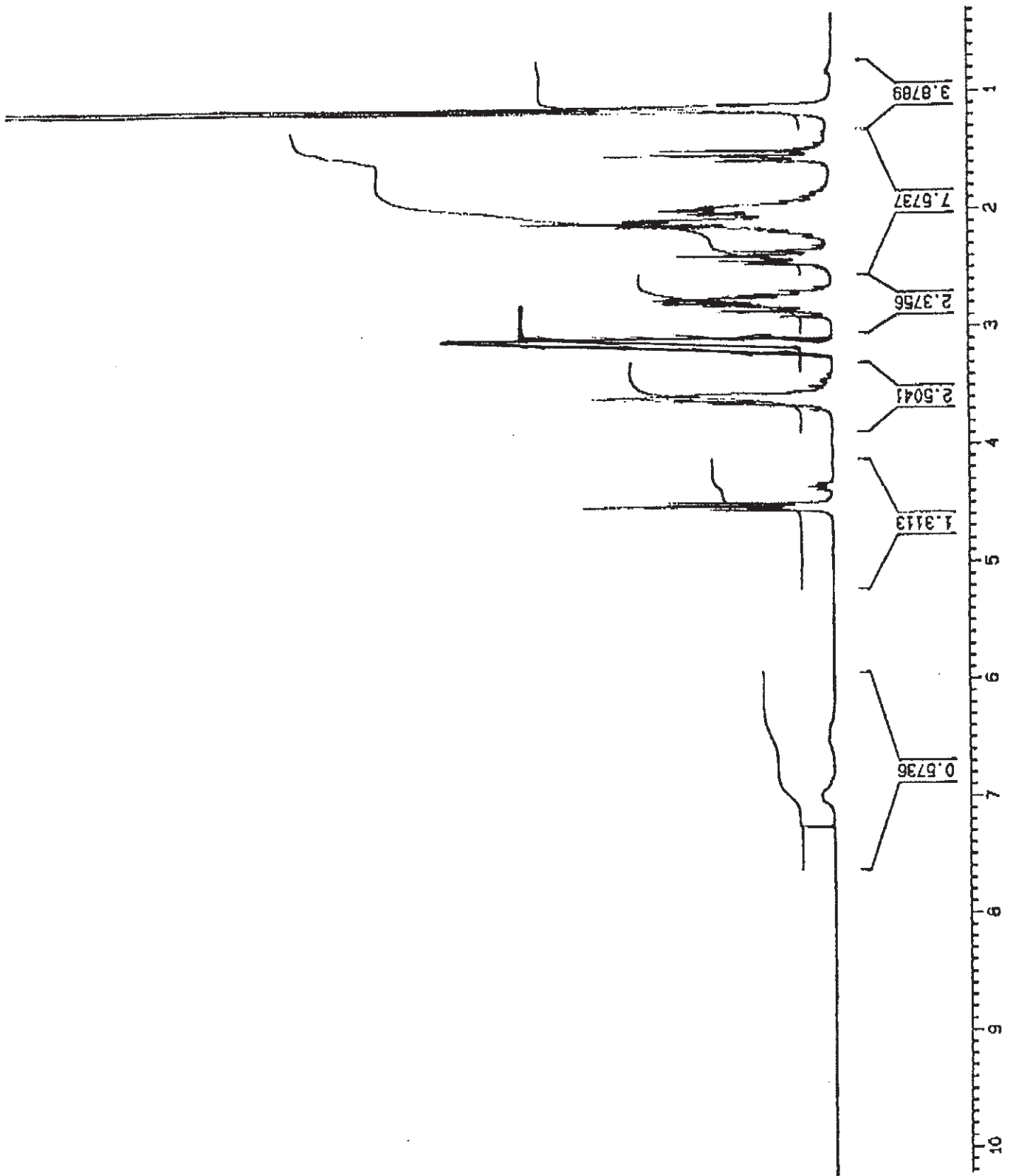
Spectre n°5 : Spectre IR du captopril et du produit A..



Spectre n°6 : Spectre IR du produit B.



Spectre n°7 : Spectre RMN du captopril.



Spectre n°8 : Spectre RMN du produit B.

III-2 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par RPE :

III-2-1 Evaluation par « SPIN-LABEL » : DPPH

Cette évaluation a été effectuée selon le protocole décrit auparavant sur le captopril et sur le produit B (phase organique) qui est le captopril méthylé :

- concentration en DPPH : $3,41 \cdot 10^{-3}$ M.
- concentration en captopril : 10^{-2} M.
- concentration en captopril méthylé : 10^{-2} M.

Le DPPH nous servira de référence pour l'évaluation de l'activité antiradicalaire :

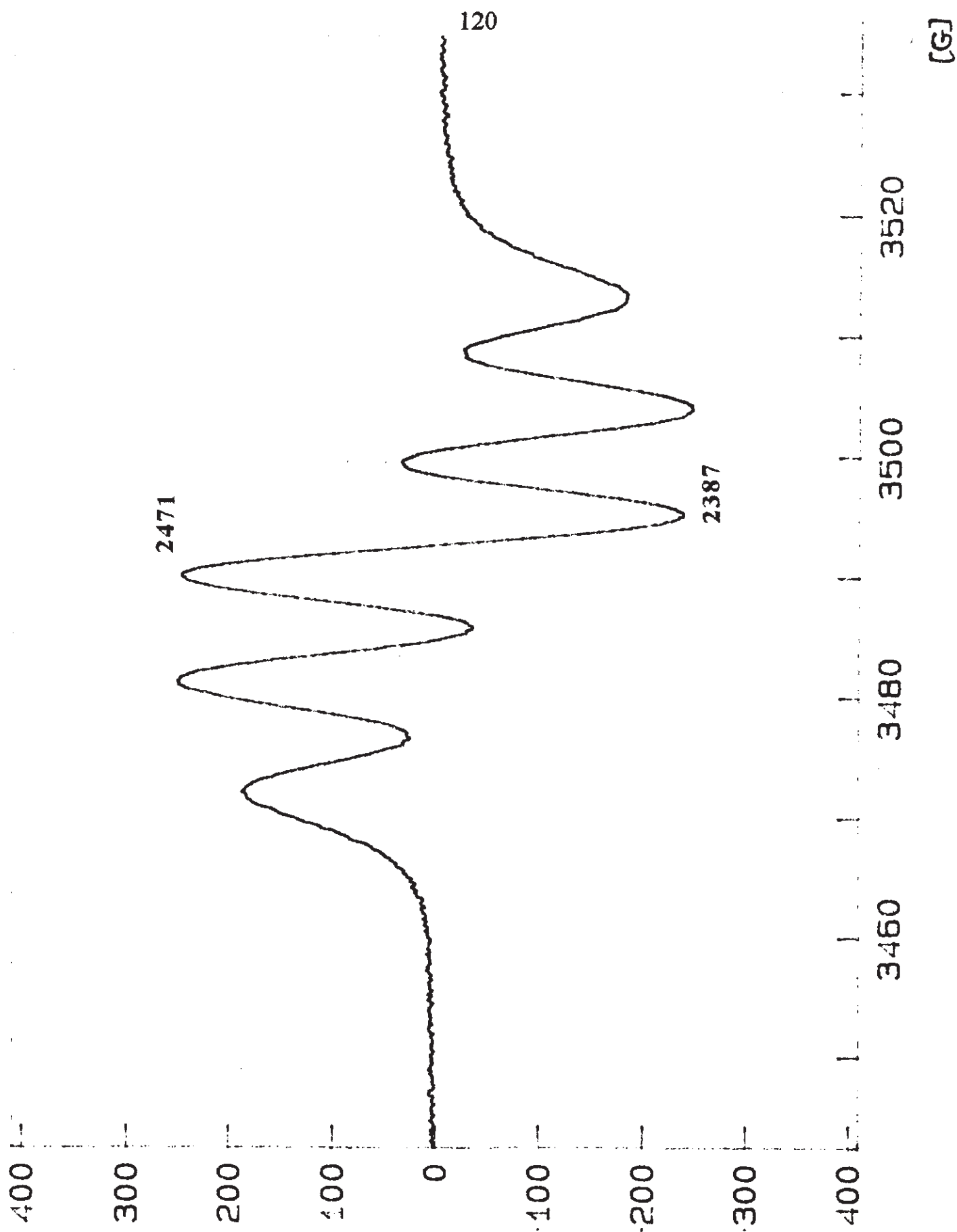
	Signal Haut	Signal Bas	Amplitude	Moyenne
DPPH	2471 2462	2387 2366	4858 4828	4843
Captopril (10^{-2} M)	1294 1680 1813	1219 1529 1766	2513 3209 3579	3100
Produit B (10^{-2} M)	2069 2620 2616	2004 2529 2537	4073 5149 5163	4795

Pour le captopril, on a en moyenne un pourcentage de radicaux libres de 64%, soit une inhibition de 36%.

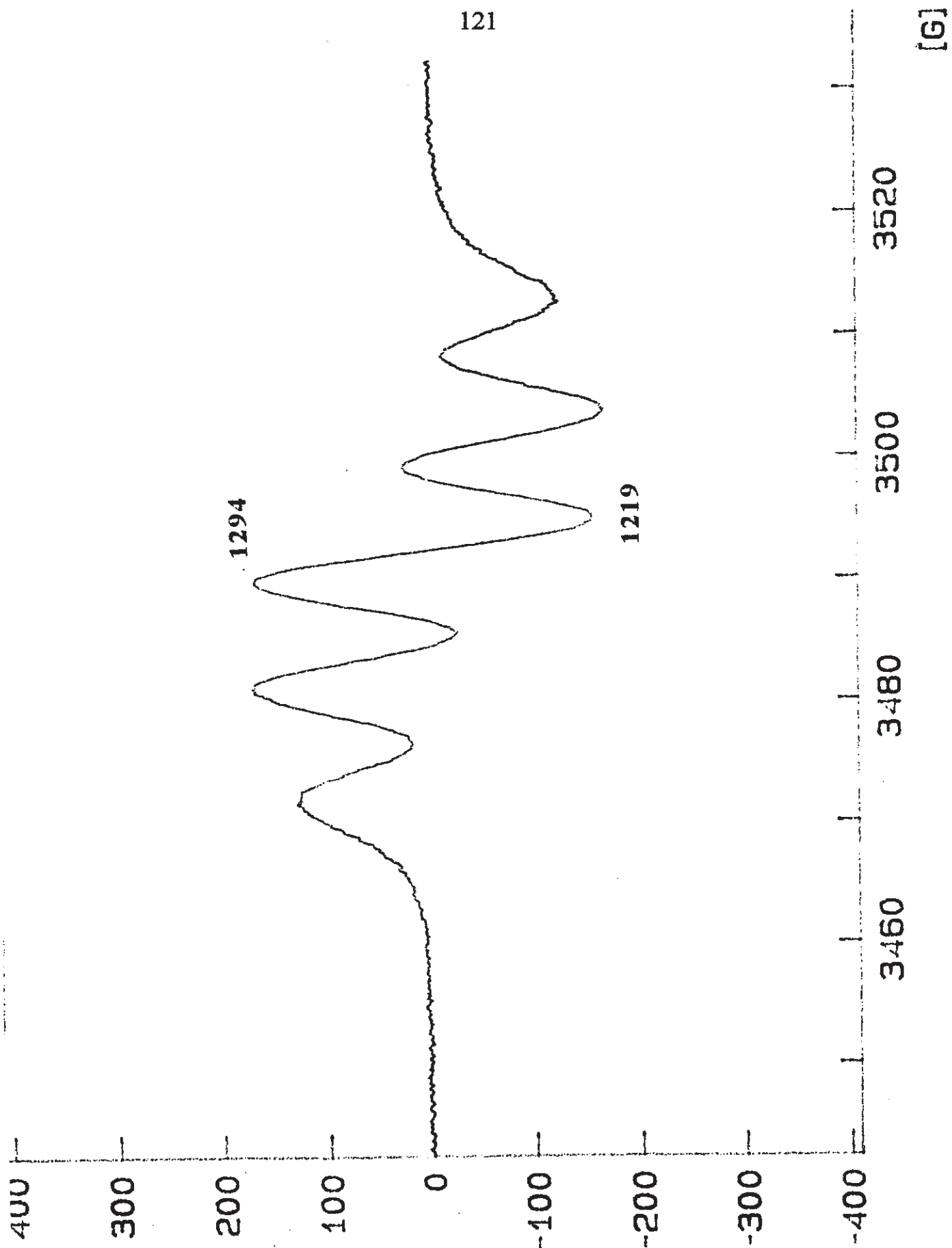
Pour le captopril méthylé, on a en moyenne un pourcentage de radicaux libres de 99%, soit une inhibition de 1%.

On a donc une inhibition supérieure du captopril.

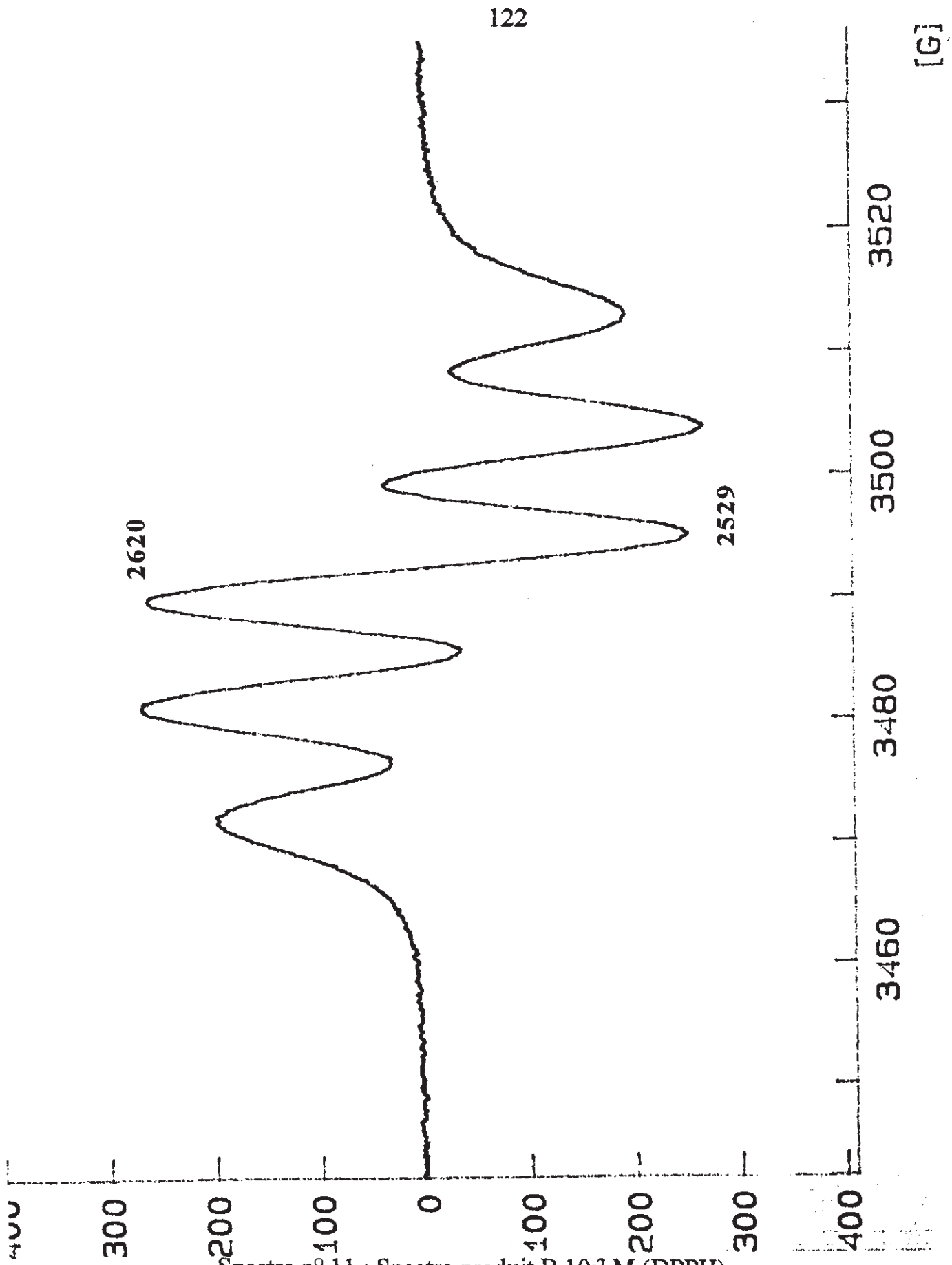
cf. Spectres 9,10,11.



Spectre n°9 : Spectre de référence DPPH.



Spectre n° 10 : Spectre du captopril 10^{-2} M (DPPH).



Spectre n° 11 : Spectre produit B 10^{-2} M (DPPH).

III-2-2 Evaluation par « SPIN-TRAP » : DMPO

Nous utilisons le protocole décrit auparavant, les paramètres utilisés lors de l'acquisition des spectres sont :

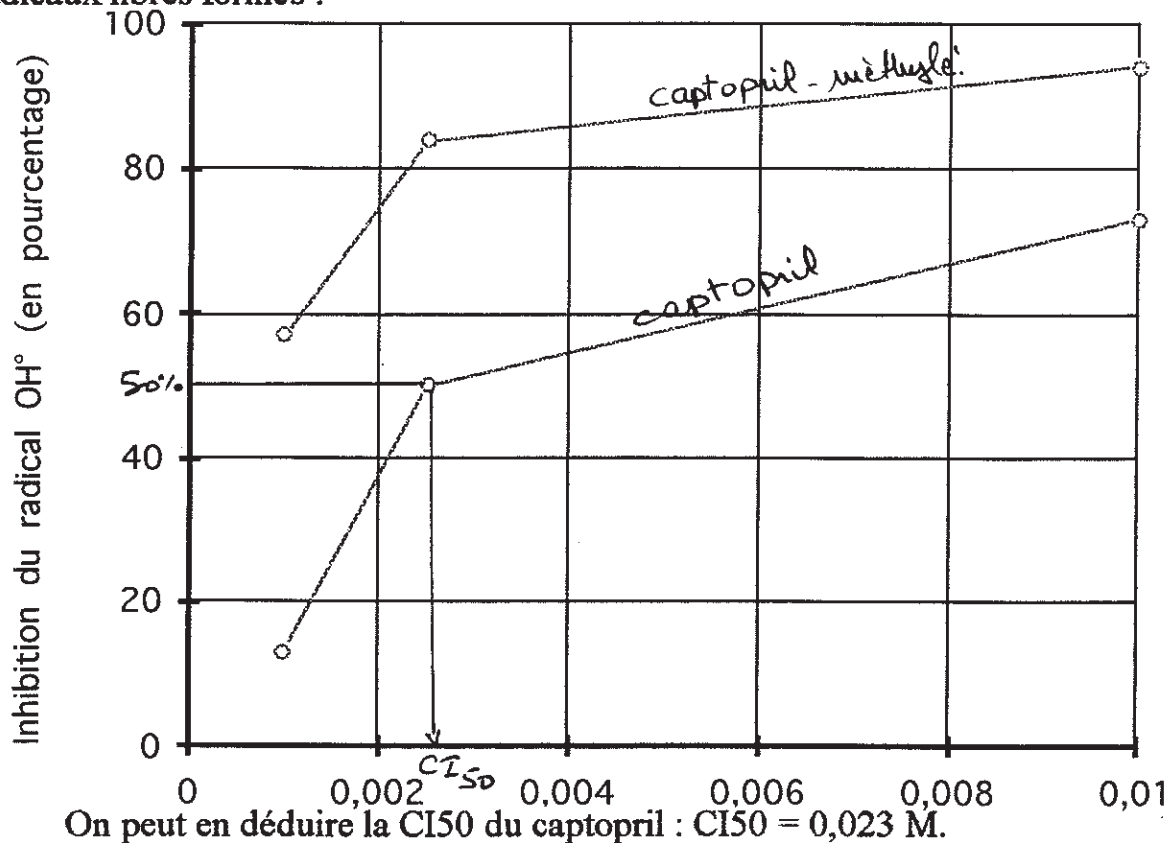
- gain : 2.10^{-4}
- modulation d'amplitude : 0,987G
- balayage: 80G
- atténuation : 15 dB

Résultas :

	Signal Haut	Signal Bas	Amplitude	Pourcentage de RL	Pourcentage d'inhibition
DMPO	2581 2451	2317 2188	4898 4639		
Captopril (10^{-2} M)	789 660	701 607	1490 1267	31% 26%	69% 74%
Produit B (10^{-2} M)	294 160	258 138	552 298	11% 6%	89% 94%
Captopril ($0.25.10^{-2}$ M)	1221	1105	2326	48%	52%
Produit B ($0.25.10^{-2}$ M)	397	360	757	15%	85%
Captopril (10^{-3} M)	2139	1918	4057	85%	15%
Produit B (10^{-3} M)	1054	942	1996	42%	58%

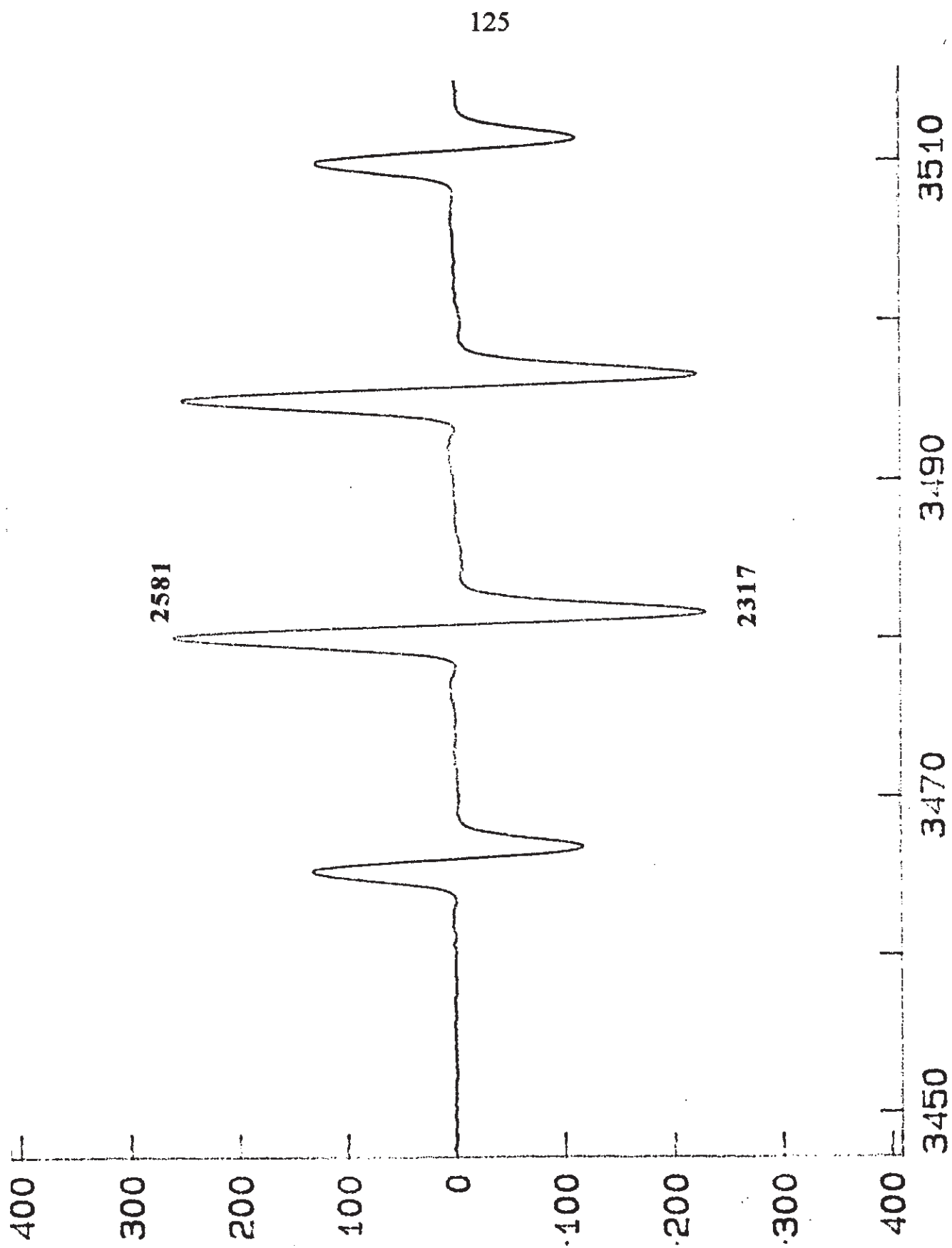
Nous avons pris comme référence la moyenne des deux amplitudes de la DMPO (4768.5),cf. spectres n° 12,13,14.

A partir de ces résultats, nous avons construit la courbe concentration en captopril et du captopril méthylé en fonction du pourcentage d'inhibition des radicaux libres formés :

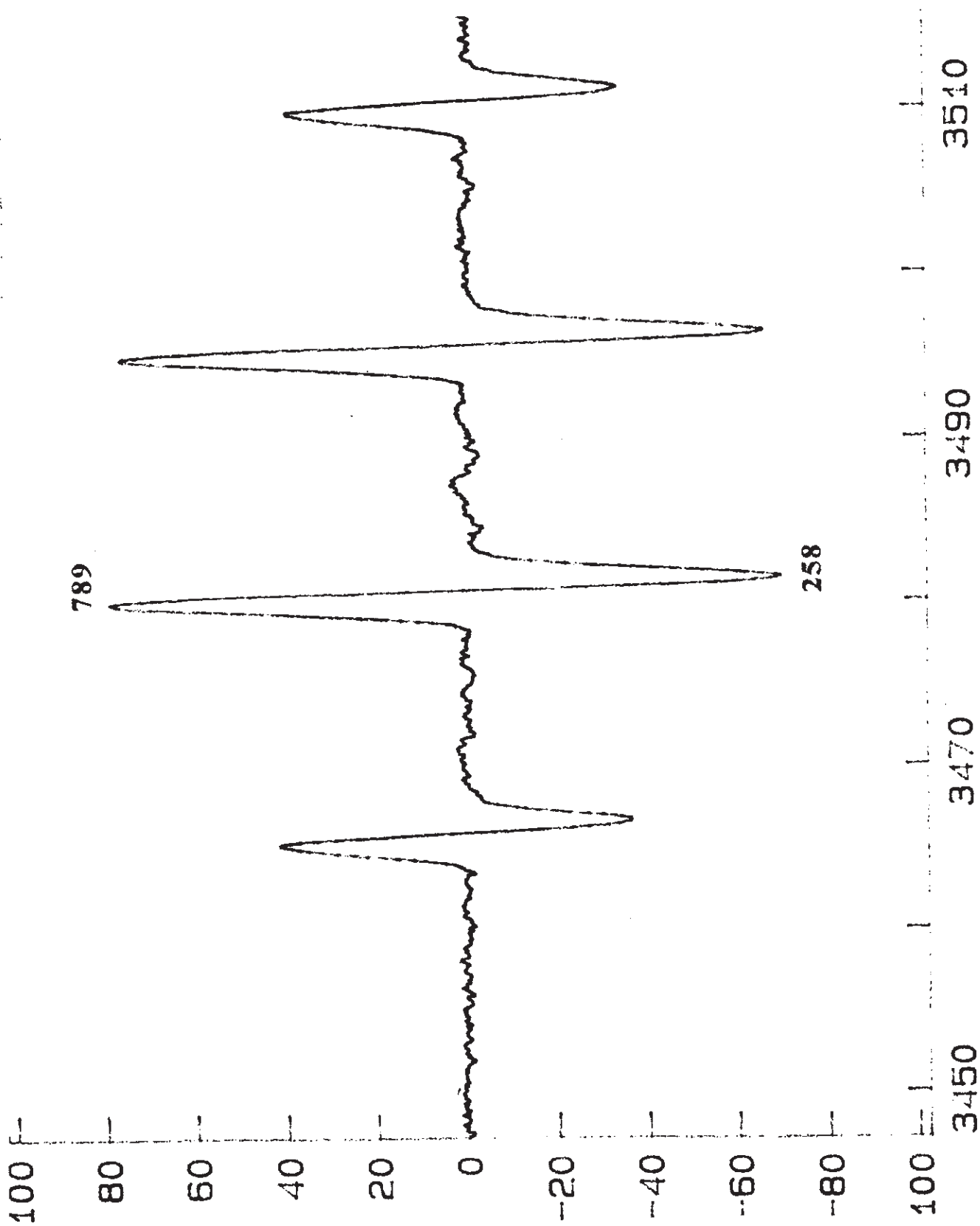


On peut aussi remarquer que les pentes et les points d'inflexions sont identiques pour les deux courbes, ce qui signifie qu'un même processus a eu lieu. De plus on a un infléchissement des deux courbes qui est du à un phénomène de saturation.

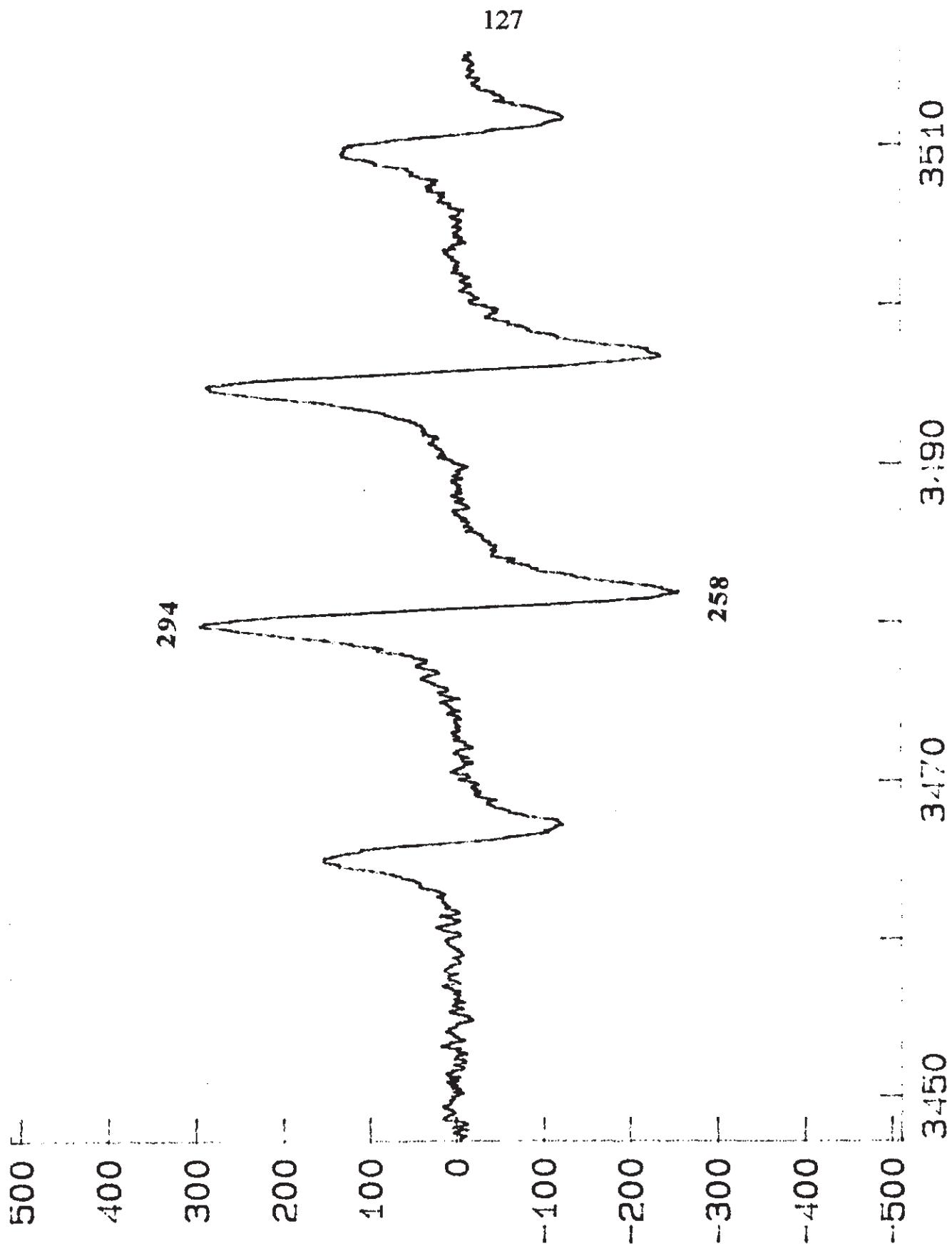
Enfin, le résultat ici est exactement inverse qu'avec le DPPH, en effet, c'est le captopril méthylé qui inhibe le plus les radicaux libres formés.



Spectre n° 12 : Spectre de référence DMPO.



Spectre n° 13 : Spectre du captopril 10^{-2} M (DMPO).



Spectre n° 14 : Spectre du produit B 10⁻² M (DMPO).

IV DISCUSSION :

Dans certaines conditions, le captopril est un puissant inhibiteur de la production des radicaux phényles produits par l'auto-oxydation des phénylhydrazines (3).

Cependant, l'effet inhibiteur du captopril a été compris comme étant une interaction directe de cette substance avec le métal qui catalyse le processus d'oxydation plutôt qu'une réaction du captopril avec des radicaux libres générés.

Cette dernière conclusion a été soutenue par une autre étude sur l'utilisation de la réduction de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par le captopril.

CUPERUS et coll. ont démontré que les composés antiartritiques contenant la fonction thiol (-SH) inhibent l'hypochlorite produit par la myéloperoxydase (55), de même que BAGCHI et coll. ont trouvés que le captopril est un inhibiteur puissant du radical anion superoxyde, du radical hydroxyl, et l'hypochlorite (56).

D'après RAKESH et coll., qui ont utilisé le système xanthine-xanthine oxydase comme générateur de radicaux libres, le captopril n'inhiberait pas directement l'anion superoxyde, il réduirait le cytochrome c de façon dose-dépendante, cette réduction serait immédiate, avant l'action de la xanthine oxydase génératrice du radical superoxyde. Cet effet serait dépendant des concentrations en xanthine oxydase, cytochrome c, et captopril, ainsi que de la durée de préincubation (4).

La cystéine aurait les mêmes effets, tandis que l'énalaprilate ne les a pas, démontrant par là que la réduction du cytochrome c provoquée par le captopril serait probablement liée à la présence du groupement -SH.

On a obtenu deux résultats apparemment contraires, cependant, cela peut s'expliquer par le fait que ce n'est pas l'hydrogène du groupement thiol qui est en cause dans les phénomènes antiradicalaires, mais le soufre lui-même.

En effet, le soufre possède deux doublets qui peuvent être responsables de l'activité du captopril.

Lorsque le captopril est méthylé, le groupement $-CH_3$ a un effet inductif positif (donneur d'électrons), ce qui fait qu'on renforce la densité électronique au niveau du soufre, donc sa capacité à fixer un radical.

Avec la DMPO, les radicaux hydroxyles formés sont plus facilement captés par le captopril méthylé.

Avec la DPPH, le radical triphényl-hydrazyl formé a un encombrement stérique important qui peut gêner la fixation par le soufre méthylé, d'où un effet du captopril supérieur au captopril méthylé.



CONCLUSION

Le captopril est le chef de file des inhibiteurs de l'enzyme de conversion qui sont utilisés dans l'hypertension artérielle. Il possède la particularité d'avoir dans sa structure un fonction thiol (SH) qui lui confère une activité antiradicalaire.

Notre étude a donc porté sur les radicaux libres, qui sont des molécules ayant une affinité élevée pour les électrons célibataires. Ce sont surtout les radicaux libres oxygénés qui sont responsables d'effets toxiques notamment lorsque les défenses de l'organisme sont dépassées, la production de radicaux libres oxygénés étant physiologique.

De nombreuses études ont portés sur l'effet antiradicalaire du captopril, en effet l'enjeu est de taille car le captopril serait le seul médicament de sa classe thérapeutique a posséder, en plus de son activité sur la tension artérielle , une activité antiradicalaire qui serait d'une importance primordiale surtout lors d'infarctus du myocarde.

On pensait que l'effet antiradicalaire du captopril était du à l'hydrogène de la fonction thiol, en fait, il apparaît au cours de cette étude que se c'est le soufre qui est responsable de cette activité.

La progression des études sur les radicaux libres est un sujet qui apparaît comme essentielle lors des prochaines années, car on découvre de jour en jour leur implication dans des pathologies très diverses, et les moyens de lutte restent pour l'instant assez limités.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique.
Médicaments Du Système Cardio-Vasculaire.
Ed. Méd. Int., Traité de chimie thérapeutique, Vol.3.
- 2 - Le Guide Pharmaco-Thérapeutique Etudiant.
VIDAL[®].
Ed. du VIDAL[®], 1994-1995, pp.143-172.
- 3 - DAVID J., ADELA C., RAFAEL Z., EDOUARDO M., ROBERTO G.,
Captopril Does Not Scavenge Superoxide : Captopril Prevents $O_2^{\cdot-}$
Production by Chelating Copper.
Archives Of Biochemistry And Biophysics, Vol. 290, N°2, 1991,
November 1, pp. 463-467.
- 4 - RAKESH C. K., HERMES A. K., MICHAEL L.H.,
Captopril and Enalaprilate Do Not Scavenge the Superoxide Anion.
The American Journal of Cardiology, Vol.65, May 22, 1990 : pp.241-271.
- 5 - DODET B.,
La chasse aux radicaux libres oxygénés.
Biofutur, mai 1991, 23-24.
- 6 - CEROU S.,
Radicaux libres et pathologie humaine, actualisation et perspectives
d'avenir
These D.E. N° : Pharm., Limoges, 1994.

- 7 - DROY-LEFAIX M.T., FERRADINI C., GARDES-ALBERT M.,
Les radicaux libres en dix questions.
Ed. IPSEN.
- 8 - TISON E., MILLAIRE A., DEGROOTE P., DUCLOUX G.,
Les radicaux libres en pathologie cardiovasculaire.
Lille médical, 1989, XXIX, 7 : 295-307.
- 9 - PIERRE J.L.
Chimie de l'oxygène.
Club d'étude des Radicaux libres en biologie, mars 1991 : 1-18.
- 10 - RYBAK B.,
Biologie de l'oxygène.
Ed. Maloine, 1974.
- 11 - FAVIER A.
Défense de l'organisme contre les radicaux libres.
Club d'étude des radicaux libres en biologie, mars 1991.
- 12 - MENASCHE PH.,
Deux sources de radicaux libres en chirurgie cardiaque.
Cardio Plus, 1992, 45 : 1-2.
- 13 - TERRAIL F.,
Radicaux libres et vieillissement cutané.
Thèse D.E. n°302 : Pharm, Limoges, 1992.

- 14 - BRAGEL A.,
Radicaux libres et systèmes antioxydants.
Revue française des laboratoires, 1992, 233 : 107-111.
- 15 - DUTREIX J., DESGEZ A., BOK B., CHEVALIER C.,
Bases de l'utilisation médicale et biologique des radiations.
Physique et biophysique, Ed. Masson, tome 4 : 163-202.
- 16 - CRASTES DE PAULET A.,
Radicaux libres et vieillissement.
Cah Nutr Diet, 1992, XXVI, 2 : 137-143.
- 17 - BERMOND P.,
Radicaux libres et vieillissement.
Cah Nutr Diet, 1991, XXVI, 6 : 403-407.
- 18 - GODART PH., BOUSQUET J., CLAUZEL A.M., TERRAL C.,
MICHEL F.B.,
Le suivi thérapeutique de l'asthmatique.
9ème journée internationale de pneumo-allergologie - Montpellier
Ed. Ellipses, 1989 : 14-17.
- 19 - ARTIGOU J.Y.,
Coeur et radicaux libres.
Cardiologie pratique, 1992, 219 : 1-4.

- 20 - BERNIER M., HEARSE D.J., MANNING A.S.,
Reperfusion induced arrhythmias and oxygen derived free radicals : studies with « anti-free radical » interventions and free radical generating system in the isolated perfused rat heart.
Circ Res, 1986, 58 : 331-340.
- 21 - DE LEIRIS J., CHARLON V.,
Perturbations métaboliques engendrées par l'ischémie myocardique : implication des radicaux libres de l'oxygène.
Ann de cardiologie et d'angéiologie, 1986, 35, 7bis : 427-431.
- 22 - DEBY C., PINCEMAIL J.,
Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense.
La Presse Médicale, 1986, 15, (31), 1468-1474.
- 23 - PELMONT J.
Enzymes.
Presses Universitaires de Grenoble, 1989, 497-498.
- 24 - COUDERT P., RUBAT C., SAUTOU V., BASTIDE M., MALHURET R.,
Dossier : Les radicaux libres.
Actualités Pharmaceutiques, Juin 1994, n° 321.
- 25 - LÉBOULANGER J.,
Les Vitamines - Modes d'action - Intérêt thérapeutique.
Laboratoires Roche.

- 26 - CLAVEL J.P., EMERIT J., THUILIER A.,
Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en
pathologie.
Path. Biol., 1985, 33, (1), 61-69.
- 27 - CHACHATY C.
Spectrométrie par Résonance Paramagnétique.
Technique de l'ingénieur, 1984, p. 2885-1.
- 28 - BIGNAUD E.,
La R.P.E. : Principe, application aux radicaux libres.
Thèse D.E. Pharm, Poitiers, 1987.
- 29 - RAFFI J., RUBEL G.,
Une méthode rapide d'identification des aliments ionisés : la R.P.E.
Analysis, 1990, 18, 10.
- 30 - PERKINS M. J.,
Essays in Free Radical Chemistry.
Special Publication n°24, Chemical Society, London, 1970, p.97.
- 31 - PERKINS M. J.,
Adv. Phys. Org. Chem., 1980, 17, 1.
- 32 - LAGERCRANTZ C.,
J. Phys. Chem., 1971, 75, 3466.

- 33 - JANZEN E.G.,
Acc. Chem. Res., 1971, 4, 31.
- 34 - JANZEN E.G., EVANS C. A., DAVIS E. R.,
Organic Free Radicals.
American Chemical Society, 1978, P.433.
- 35 - JANZEN E.G.,
Free Radicals Biol., 1980, 4, 115.
- 36 - FINKELSTEIN E., ROSEN G.M., RAUCKMAN E.J.,
Arch. Biochem. Biophys., 1980, 200, p.1.
- 37 - KALANARAMAN B.,
Rev. Biochem. Toxicol., 1982, 4, p.73.
- 38 - JANZEN E.G.,
Spin trapping.
METHODS IN ENZYMOLOGY, 1984, vol. 105, 188-198.
- 39 - ROSEN GERALD M., RAUCKMAN ELMER J.,
Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals.
METHODS IN ENZYMOLOGY, 1984, vol. 105, 198-209.
- 40 - INGOLD K. U.,
Free Radicals.
Wiley, New York, 1973, Vol. 1, p. 37.

- 41 - HAIRE D. L., JANZEN E.G.,
Can. J. Chem., 1982, 60, p. 1514.
- 42 - FINKELSTEIN E., ROSEN G.M., RAUCKMAN E.J.,
Mol. Pharmacol., 1979, 16, p.676.
- 43 - CZAPSKI GIDON,
Reaction of OH·
METHODS IN ENZYMOLOGY, 1984, vol. 105, 209-295.
- 44 - HARDEN M., Mc CONNELL, GAFFNEY B., Mc FARLAND.,
Physics and Chemistry of spin labels.
Quartely Reviews Of Biophysics (GB), 1970, 3, 1, 91-136.
- 45 - FATIMI J., LAGORCE J.F., DUROUX J.L., CHABERNAUD M.L.,
BUXERAUD J., and RABY C.,
1,4,5-Trialkyl Imidazole System Anti-inflammatory Properties of New
Substitued Derivaties.
Chem. Pharm. Bull., 1994, 42, (3), 698-701.
- 46 - MOESCH C.,
Sulfures d'Alkyles,
Thèse D.E. : Pharm., Limoges, 1987.
- 47 - STARKS C.M.
Phase-transfer catalysis. I - Heterogeneous reactions involving anion
transfer by quaternary ammonium and phosphonium salts.
J. Amer. Chem. Soc. , 1971, 93 , 195-199.

- 48 - CAUBERE P.
Le transfert de phase et son utilisation en chimie organique.
Masson, Paris, 1982.
- 49 - LANDINI D., ROLLA F.
A convenient synthesis of primary and secondary dialkyl and aryl alkyl sulfides in the presence of phase-transfer catalyst.
Synthesis, 1974, 565-566.
- 50 - D'INCAN E., VIOUT P.
Orientation de l'alkylation d'anions ambidents par les sels d'ammonium quaternaire dans les conditions de la catalyse par transfert de phase.
Tetrahedron, 1975, 31, 159-164.
- 51 - BRANDSTROM A.
Ion-pair extraction as a tool for the study of mechanisms of reactions related to phase-transfer catalysis.
Pure Appl. Chem., 1982, 54, 1769-1782.
- 52 - BRANDSTROM A.
Preparative ion-pair extraction. An introduction to theory and practice.
Apothekar societeten - Hässle Läkemedel, 1974.
- 53 - DEHMLOW E.V., DEHMLOW S.S.
Phase-transfer catalysis.
Monographs in Modern Chemistry, Vol.11, Verlag Chemie, Weinheim and Deerfield Beach, FL, 1980.

- 54 - HASSANALY P., DOU H. J. M., METZGER J.,
S-Alkylation of 2-Thioxo-2,3-dihydroimidazole and its 1-Méthyl Derivate
under Phase-Transfer Conditions.
Communications, April 1977, p.253.
- 55 - CUPERUS R.A., MUIJSERS A. O., WEVER R.,
Arth. Rheum.28 , 1985 : 1228-1233.
- 56 - BAGCHI D., PRASAD R., DAS D.K.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 158, 1989 : 52-57.

SOMMAIRE

<u>REMERCIEMENTS</u>	2
<u>PLAN</u>	8
<u>INTRODUCTION</u>	15

PREMIERE PARTIE

I/ INTRODUCTION : GENERALITES SUR LE CAPTOPRIL	18
I-1 D.C.I.	18
I-2 Nom scientifique	18
I-3 Formule développée	18
I-4 Masse moléculaire	18
I-5 Structure	18
I-6 Caractéristiques physico-chimiques	19
I-6-1 Caractères	19
I-6-2 Solubilité	19
I-6-3 Pouvoir rotatoire spécifique	19
I-6-4 Spectre I.R.	19
I-6-5 Spectre R.M.N.	19
I-6-6 Spectre de masse	20
I-6-7 Identification	20
I-6-8 Dosage	20
I-7 Classification	21
I-8 Molécule chimique la plus voisine	21
I-9 Référence de classement	21
I-10 Commercialisation	21
I-11 Appartenance au tableau des substances vénéneuses	21
I-12 Synthèse	23

II/ MECANISME D'ACTION DU CAPTOPRIL	24
II-1 Physiologie du système rénine - angiotensine - aldostérone	25
II-2 Points d'impacts des antihypertenseurs sur le système rénine angiotensine	27
II-3 Structure et mécanisme d'action du captopril	28
II-3-1 Au niveau physiologique	28
II-3-2 Interactions structure - récepteurs	28
II-3-3 Relation structure - activité	29
III/ PHARMACOLOGIE	31
III-1 Propriétés hémodynamiques	31
III-1-1 Hypertension artérielle	31
III-1-1-1 Au niveau de l'enzyme de conversion	31
III-1-1-2 Chez l'hypertendu	31
III-1-1-3 Au niveau des gros troncs artériels	31
III-1-1-4 Au niveau du débit rénal et cérébral	31
III-1-2 Insuffisance cardiaque	32
III-1-2-1 Mécanismes simplifiés de l'insuffisance cardiaque	32
III-2 Pharmacocinétique	33
III-2-1 Chez le sujet sain	33
III-2-2 Chez les sujets hypertendus	34
III-2-3 Chez les insuffisants rénaux	34
III-2-4 Chez les patients dialysés	34
III-2-5 Concentration de captopril dans le lait des femmes allaitantes	34
III-3 Effets sur l'équilibre hydro - électrolytique	35
III-4 Autres effets	35

IV/ MODALITES THERAPEUTIQUES	35
IV-1 L'hypertension artérielle	35
IV-2 Choix du traitement	36
IV-3 Intérêts thérapeutiques des IEC	36
IV-4 Captopril	37
IV-4-1 Indications	37
IV-4-2 Mode d'emploi et posologie	37
IV-4-2-1 Hypertension artérielle	37
IV-4-2-2 Insuffisance cardiaque congestive	37
IV-4-2-3 Posologie	38
IV-4-3 Contre-indication	38
IV-4-4 Mise en garde	39
IV-4-5 Précautions d'emploi	39
IV-4-5-1 Traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque congestive	39
IV-4-5-2 Traitement de l'insuffisance cardiaque congestive	40
IV-4-5-3 Grossesse	40
IV-4-6 Interactions médicamenteuses	41
IV-4-7 Effets indésirables	41
IV-4-8 Surdosage	42
IV-4-9 Conditions d'une substitution à un autre antihypertenseur	42
V/ BUTS DE LA MANIPULATION	43

DEUXIEME PARTIE

I/ PRESENTATION DES RADICAUX LIBRES	47
I-1 DEFINITION	47
I-2 PROPRIETES DES RADICAUX LIBRES	48
I-2-1 Réactivité des radicaux libres	48
I-2-2 Energie des radicaux libres	48
I-2-3 Cinétique des radicaux libres	49
I-3 FORMATION DES RADICAUX LIBRES	50
I-3-1 Radicaux libres provenant de l'oxygène	51
I-3-1-1 Radicaux libres oxygénés	51
I-3-1-2 Oxygène de l'air	51
I-3-1-3 L'anion superoxyde	52
I-3-1-4 Le peroxyde d'hydrogène	53
I-3-1-5 Le radical hydroxyle	55
I-3-1-6 L'oxygène singulet	57
I-3-2 Sources physiologiques des radicaux libres	57
I-3-2-1 La chaîne respiratoire mitochondriale	58
I-3-2-2 La phagocytose	59
I-3-2-3 La synthèse des prostaglandines	64
I-3-2-4 Les réactions enzymatiques	65
I-3-2-5 Les réactions de détoxication	66
I-3-2-6 Les rayonnements	66
II / PHENOMENES TOXIQUES DES RADICAUX LIBRES	68
II-1 Phénomènes toxicologiques	68
II-2 Toxicité médicamenteuse	69

III / POUVOIR PATHOGENE DES RADICAUX LIBRES	69
III-1 Mécanisme de l'agression radicalaire	70
III-2 Cibles biologiques	70
III-2-1 Acides nucléiques	70
III-2-2 Protéines	71
III-2-3 Phospholipides membranaires	72
III-2-3-1 Structure de la membrane cellulaire	72
III-2-3-2 Destructuration membranaire	73
III-2-3-3 Conséquences de la peroxydation lipidique	78
III-3 Radicaux libres et pathologie cardio-vasculaire	79
III-3-1 Ischémie-reperfusion du myocarde	79
III-3-2 Autres points d'impacts des radicaux libres	81
III-3-2 -1 Nécrose myocardique	81
III-3-2 -2 Arythmies de reperfusion	81
III-3-2 -3 Athérosclérose	82
III-3-2 -4 Hyperagrégation plaquettaire	82
III-3-2 -5 Vasospasme cérébral	83
IV / SYSTEMES PHYSIOLOGIQUES DE DEFENSE FACE A LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES	84
IV-1 Systèmes de défense enzymatiques	84
IV-1-1 La superoxyde dismutase	84
IV-1-2 Les enzymes de destruction des peroxydes	85
IV-1-2-1 Les catalases	85
IV-1-2-2 La glutathion peroxydase	86

IV-2 Les piègeurs de radicaux libres	87
IV-2-1 L'alpha-tocophérol ou vitamine E	87
IV-2-2 L'acide L-ascorbique ou vitamine C	88
IV-2-3 Les caroténoïdes et la vitamine A	88
IV-2-4 Le glutathion	88

TROISIEME PARTIE

I/ METHODE D'ETUDE UTILISEE : LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE 91

I-1 Définition	91
I-2 Principe	91
I-3 Appareillage	94
I-4 Méthodes d'analyse	95
I-4-1 Le « SPIN-TRAP »	95
I-4-1-1 Principe	95
I-4-1-2 Protocole expérimental	97
I-4-2 Le « SPIN-LABEL »	99
I-4-2-1 Principe	99
I-4-2-2 Protocole expérimental	100

II/ THIOALKYLATION PAR CATALYSE PAR TRANSFERT DE PHASE	101
II-1 Principe de la CTP	101
II-2 Mécanisme réactionnel	102
II-3 Equations théoriques	104
II-4 Cinétique	104
III/ RESULTATS	107
III-1 Méthylation du captopril	107
III-1-1 Conditions opératoires	107
III-1-2 Essais de solubilité	108
III-1-3 Points de fusion	108
III-1-4 Spectres U.V.-Visible	109
III-1-5 Spectres Infra-Rouge	113
III-1-6 Spectres RMN	113
III-2 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par RPE	119
III-2-1 Evaluation par « SPIN-LABEL »	119
III-2-2 Evaluation par « SPIN-TRAP »	123
IV/ DISCUSSION	128
<u>CONCLUSION</u>	131
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	133
<u>SOMMAIRE</u>	143



