

Les cibles, les mécanismes photochimiques primaires et les systèmes de défenses antioxydantes dans la cellule soumise aux radiations ultraviolettes

Targets, primary photochemical processes and antioxidant defenses of UV irradiated cells

Professeur René SANTUS (*)

RÉSUMÉ

Dans la partie UVB de spectre solaire (290 - 315 nm), on attribue l'efficacité maximale des effets photobiologiques à des réactions photochimiques directes sur les acides nucléiques — en tout premier lieu sur les bases pyrimidiques (formation de dimères, notamment) — et sur le tryptophane, le seul acide aminé aromatique des protéines qui absorbe l'UVB solaire. En ce qui concerne les réponses biologiques à l'UVA, on admet qu'elles sont dues à des réactions photochimiques indirectes, encore appelées réactions photosensibilisées, qui concernent la presque totalité des constituants cellulaires : acides aminés, bases puriques, lipides insaturés, par exemple. Ces réactions photosensibilisées impliquent la formation de différentes espèces activées de l'oxygène comme l'oxygène singulet, l'ion superoxyde et les radicaux OH[•]. Pour lutter contre la formation excessive de ces espèces activées de l'oxygène, la cellule a développé différents systèmes de défense : enzymes - molécules « antioxydantes » - protéines de piégeage ou de « désactivation » des ions métalliques responsables de la propagation des chaînes de la peroxydation lipidique.

ABSTRACT

In the UVB part of the solar ultraviolet spectrum (290 - 315 nm), the effectiveness of the photobiologic response is due to direct photochemical reactions on pyrimidine or tryptophan residues of proteins. The biological response to UVA (320 - 400 nm) is due to photosensitized reactions.

Many biological molecules or macromolecules including aminoacids, purine bases, polyunsaturated fatty acids... are targets of photosensitized reactions via formation of singlet oxygen, superoxide anion and OH[•] radicals. To cope with the formation of excess oxygen activated species, cells possess several defense systems such as enzymes, small antioxidant molecules, or proteins able to trap redox metal ions responsible for the propagation of the radical chain reactions of lipid peroxidation.

1. Introduction

Les spectres d'action (c'est-à-dire les spectres d'efficacité de la réponse biologique en fonction de la longueur d'onde d'irradiation) de la réponse photoérythématogène ou de la photocarcinogénèse cutanée montrent une efficacité maximum vers 290 - 300 nm qui décroît très rapidement jusqu'à 320 nm puis beaucoup plus lentement dans l'UVA

(320 - 400 nm) (fig. 1). Cette rupture très nette au-delà de 320 nm est attribuée au changement de mécanismes dans les phénomènes photochimiques responsables de la réponse biologique. On admet que l'efficacité très grande observée dans l'UVB solaire (région comprise dans la zone 295 - 320 nm) est principalement due à des réactions photochimiques directes affectant les bases pyrimidiques des acides nucléiques (formation notamment de dimères) ou les résidus tryptophane des protéines (1). La réponse photobiologique observée au-delà est due à des réactions photosensibilisées impliquant des processus oxydatifs via la formation d'espèces activées de l'oxygène.

(*) *Laboratoire de Physico-Chimie de l'Adaptation Biologique (INSERM U 321), Muséum d'Histoire Naturelle, 43, rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05.*

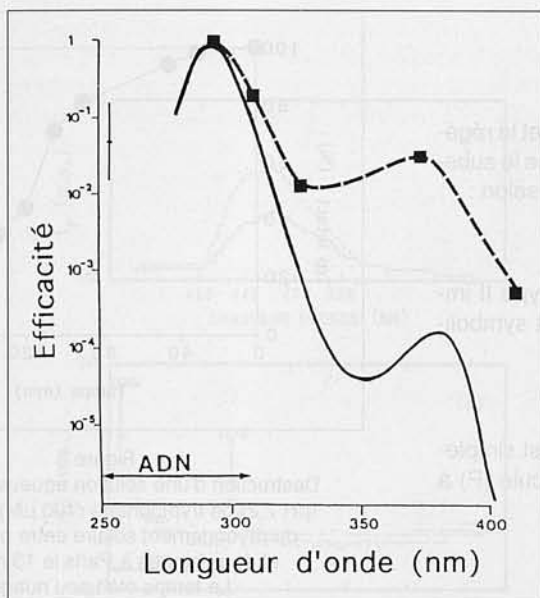


Figure 1

Spectres d'action pour l'induction de cancers cutanés non mélaniques chez la souris (—) et mélaniques chez le poisson *Xiphophorus* (----).

(d'après Setlow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 6666, 1993 et De Gruijl *et al.*, Cancer Res., 53, 1993).

Action spectra for the induction of non melanoma skin cancers in mice (—) and of melanoma in the fish *Xiphophorus* (----) (after Setlow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 6666, 1993, and De Gruijl *et al.*, Cancer Res., 53, 1993).

Dans cet article, nous nous intéressons tout particulièrement aux mécanismes de ces réactions photosensibilisées et aux moyens de défense de la cellule contre le stress oxydatif qu'elles engendrent.

2. Activation de l'oxygène par les réactions photosensibilisées

a) Qu'est-ce qu'une réaction photosensibilisée ?

On appelle réaction photosensibilisée toute réaction photochimique dans laquelle une molécule (appelée substrat) qui n'absorbe pas directement des radiations lumineuses est détruite en présence d'un composé (le photosensibilisateur) qui absorbe ces radiations. Lorsque la réaction photosensibilisée implique l'oxygène, on dit que l'on est en présence d'une réaction photodynamique (1).

b) Considérations électroniques élémentaires

La figure 2 schématise l'adsorption de radiations lumineuses par une molécule. Lors de l'absorption de photons d'énergie convenable, un des deux électrons de l'orbitale moléculaire la plus haute, occupée à l'état fondamental, est promu sur l'orbitale moléculaire non occupée la plus basse, sans changement de spin de l'électron. On constate alors que la molécule excitée résultante est

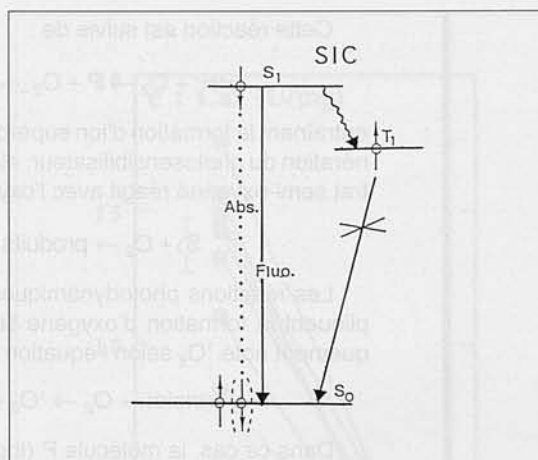


Figure 2

Schéma des transitions électroniques dans une molécule aromatique

(SIC est le système d'intercombinaison singulet triplet).

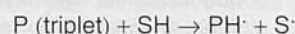
Scheme of the electronic transitions of aromatic molecules (SIC is the intersystem crossing).

encore, tout comme l'état fondamental, dans un état de spin total nul (état dit « singulet » qui est diamagnétique). Si l'énergie absorbée est suffisante pour casser une liaison chimique, on assiste alors à une réaction photochimique *directe*. Les réactions photochimiques directes des molécules aromatiques impliquent presque toujours un état singulet excité. A partir du premier état singulet excité, (c'est-à-dire celui correspondant à la bande d'absorption de plus grande longueur d'onde d'une molécule) la désactivation de la molécule peut s'effectuer (en général en quelques nanosecondes) de deux façons : soit par l'émission d'une fluorescence, de grand intérêt analytique, soit par inversion de l'état de spin de l'électron excité. Dans ce dernier cas, la molécule résultante possède un spin total de 1 ; la molécule est alors dans un état triplet paramagnétique dont la durée de vie peut aller de la microseconde à la seconde (selon la « rigidité » du microenvironnement) à la température ordinaire. Cette durée de vie très longue de l'état triplet par rapport à l'état singulet augmente considérablement la probabilité de collision et donc d'interaction et/ou de réaction avec d'autres molécules. Les réactions photosensibilisées impliquent donc presque toujours l'état triplet d'une molécule.

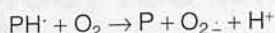
c) Les mécanismes des réactions photodynamiques

Il existe deux types de réactions photodynamiques (2) qui peuvent être résumés de la façon suivante :

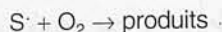
le type 1 : le photosensibilisateur (P) à l'état triplet réagit avec un substrat donneur d'atome d'hydrogène ou d'électrons (SH) (et qui, rappelons-le, n'absorbe pas les photons absorbés par P).



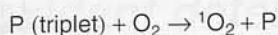
Cette réaction est suivie de :



entraînant la formation d'ion superoxyde et la régénération du photosensibilisateur, alors que le substrat semi-oxygéné réagit avec l'oxygène selon :



Les réactions photodynamiques de type II impliquent la formation d'oxygène singulet symboliquement noté $^1\text{O}_2$ selon l'équation :



Dans ce cas, la molécule P (triplet) est simplement désactivée pour redonner la molécule (P) à l'état fondamental (singulet).

d) Les principaux substrats d'intérêt biologique des réactions photodynamiques (2)

— *substrats de type 1* : Il s'agit des acides aminés (Trp, Cys) des bases puriques ; tout spécialement la guanine, les acides gras insaturés (3) (la réaction dans ce cas est l'abstraction des hydrogènes allyliques), les vitamines E et C.

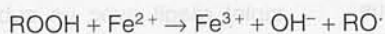
— *substrats de type 2* : On retrouve les mêmes catégories de molécules biologiques que ci-dessus : les résidus acides aminés : Trp, Cys complétés par Met et His, les acides gras insaturés (RH) notamment les acides linoléique et arachidonique, par addition d'oxygène singulet sur les doubles liaisons de ces molécules. Notons aussi la réaction spécifique du cholestérol avec $^1\text{O}_2$ avec la formation du 5α -cholestérol hydroperoxyde et les réactions bien connues de $^1\text{O}_2$ avec les vitamines E et C.

e) Remarques sur quelques produits de réaction

— Le tryptophane, par réaction avec $^1\text{O}_2$ donne la N'formylcynurénine (NFC) qui est elle-même un photosensibilisateur. Notons que la photolyse directe de Trp conduit, elle aussi, à la formation de NFC.

Ainsi la formation de $^1\text{O}_2$ par la NFC entraîne une accélération de la dégradation du cycle indole du Trp (fig. 3). On a donc l'exemple d'une réaction photochimique directe produite par l'UVB « amplifiée » par l'UVA à cause du produit photochimique (la NFC) formé sous UVB (1).

— Les peroxydes lipidiques (ROOH) donnent une réaction formellement équivalente à la réaction de Fenton en présence d'ions ferreux



Le radical RO^- formé est presque aussi réactif que le radical hydroxyle OH^- et propage les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique en

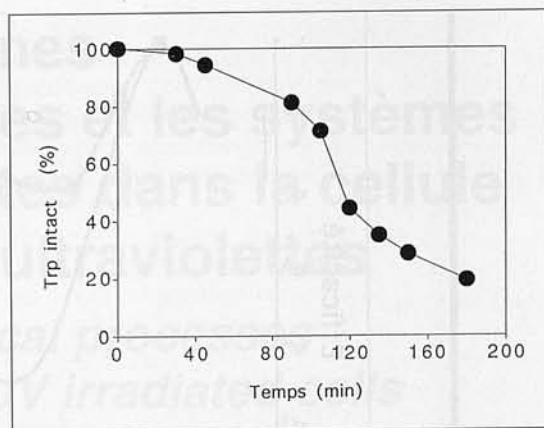


Figure 3

Destruction d'une solution aqueuse tamponnée (pH 7,2) de tryptophane (100 µM) sous l'action du rayonnement solaire entre onze heures et deux heures à Paris le 13 mai 1993. Le temps était peu nuageux.

Destruction of buffered (pH 7.2) aqueous Trp (100 µM) upon irradiation with solar light between 11 a.m. and 2 p.m. (solar time) in Paris on May 13 1993 (mostly sunny weather).

réagissant avec les hydrogènes allyliques des acides gras insaturés :

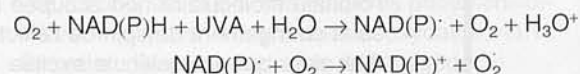


Notons que les réactions photosensibilisées au niveau de l'acide arachidonique formeront des peroxydes ayant la même structure que certains intermédiaires de la cascade enzymatique conduisant aux prostaglandines.

f) Quels sont les photosensibilisateurs endogènes de la cellule ?

En ce qui concerne les photosensibilisateurs de type photodynamique, citons les flavines oxydées, les porphyrines (dépourvues de l'ion métallique central), les ptérides, les produits transitoires ou stables du métabolisme cellulaire (exemple : la NFC) ou les produits aldéhydiques résultant des peroxydations lipidiques.

A côté de $^1\text{O}_2$ généré par ces photosensibilisateurs, certaines réactions peuvent conduire à la formation de O_2^- . A côté de la photolyse directe du Trp citons aussi, à titre d'exemple, la photooxydation du NAD(P)H. La figure 4A montre le spectre de fluorescence enregistrée dans une cellule vivante (un fibroblaste murin) soumise à une irradiation UVA (débit de dose : de l'ordre de 100 m W/cm² à 365 nm). On voit que la fluorescence du NAD(P)H disparaît rapidement sous irradiation (fig. 4B). Dans le noir, une partie du NAD(P)H est restaurée, ce qui est l'indice que la cellule peut « récupérer » et subir à nouveau une photooxydation réversible après la première irradiation UVA. La photooxydation du NAD(P)H peut s'écrire :



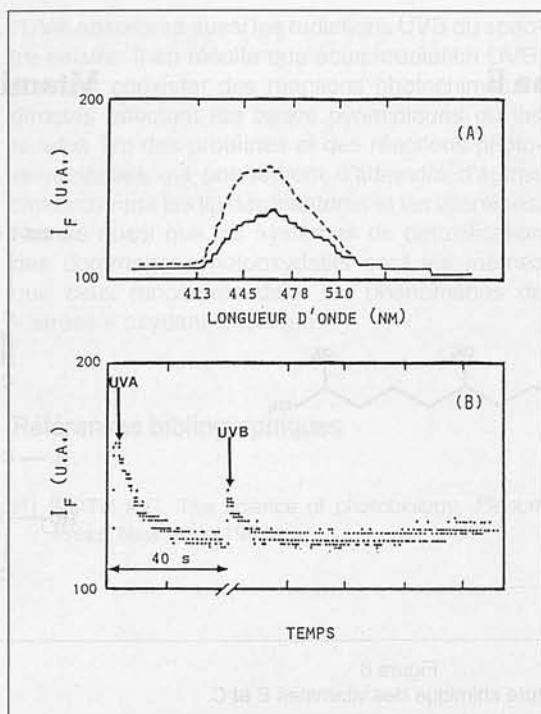


Figure 4

A - Fluorescence du NAD(P)H dans un fibroblaste murin.

B - Cinétique de la photo-oxydation du NAD(P)H cellulaire sous irradiation UVA sous l'objectif ($\times 63$) à immersion du microspectrofluorimètre.

A - Fluorescence of NAD(P)H in a murine fibroblast.
B - Kinetics of the cellular NAD(P)H photobleaching under irradiation with UVA (365 nm) under the immersion objective (63) of the microspectrofluorimeter.

Le NAD(P)⁺ n'est pas fluorescent, ce qui explique la diminution de la fluorescence dans la figure 4B.

3. Les moyens de défense de la cellule vis-à-vis des espèces activées de l'oxygène produites par l'UVA

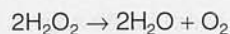
a) Les enzymes de détoxification du stress (photo)oxydatif (4)

— la superoxyde dismutase (SOD) catalyse la réaction de dismutation de O₂ :



Elle n'est pas inactivée par les radiations UVA et UVB solaires.

— la catalase catalyse la décomposition de H₂O₂



Elle est particulièrement photosensible à la fois « in vitro » et « in vivo ». Dans ce dernier cas, on a pu mettre en évidence (4) la disparition de la catalase (fig. 5) dans les fibroblastes humains provenant de différents donneurs et soumis à une dose non létale de radiations UVA.

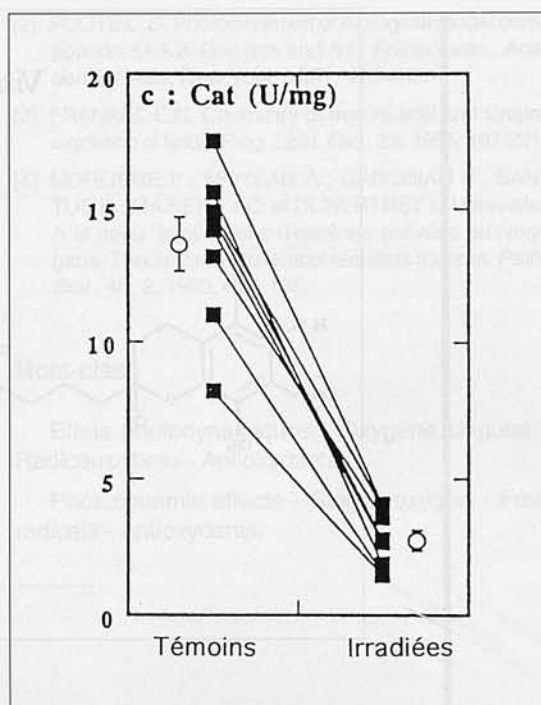


Figure 5

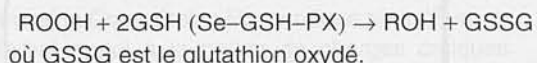
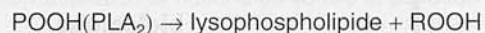
Photoinactivation de la catalase (Cat) sous l'action de 180 kJ/m² d'UVA de fibroblastes humains en culture provenant de différents donneurs (plasties membranaires). Cette dose d'UVA n'est pas létale. Les activités sont normalisées au contenu en protéines des boîtes de Petri. Les ronds blancs représentent la moyenne des activités de la catalase pour tous les donneurs.

Photoinactivation of catalase (Cat) after delivery of 180 kJ/m² of UVA. This UVA dose is not lethal. Activities are normalized to the protein content of the Petri dishes. The open symbols correspond to the mean of the catalase activities of all donors.

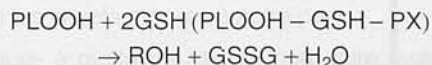
— Les glutathion peroxydases (GSH - PX). Leur « co-facteur » est le glutathion (GSH).

Il s'agit de deux classes d'enzymes qui agissent sur les peroxydes lipidiques en produisant un acide gras hydroxyle (ROH) non toxique.

→ La première contient un atome de Se (Se - GSH - PX) et n'agit qu'après intervention de la phospholipase A₂ (PLA₂) sur un phospholipide peroxydé (POOH) libérant un acide gras peroxydé (ROOH).



→ La deuxième GSH - PX est une enzyme membranaire (notée GSH - PX - PLOOH) qui agit directement sur les phospholipides peroxydés ou les peroxydes de cholestérol :



b) La détoxification par les molécules antioxydantes

Les molécules les plus connues dans ce domaine sont les vitamines E et C (fig. 6) auxquelles

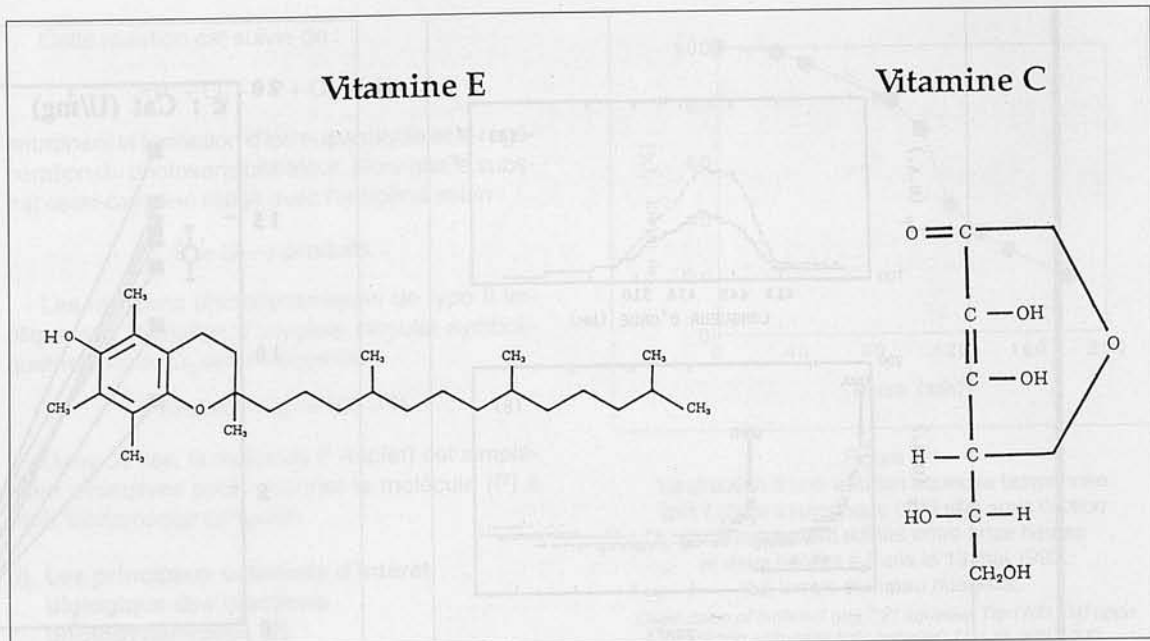


Figure 6
Structure chimique des vitamines E et C.
Chemical structure of vitamins E and C.

il faut ajouter le β -carotène et les caroténoïdes, voire les rétinoïdes. Toutes ces molécules sont capables de désactiver l'oxygène singlet plus ou moins efficacement, mais elles peuvent aussi réagir avec les radicaux $\text{OH}\cdot$ ou les radicaux libres provenant des chaînes de la peroxydation lipidique.

Le cas des vitamines E et C est intéressant sur le plan biochimique car ces molécules jouent un rôle antioxydant non seulement par désactivation de $^1\text{O}_2$ mais aussi grâce à leur propriété de donneur d'atome d'hydrogène qui leur permet de réparer les dommages biologiques dus au stress (photo) oxydatif, notamment au niveau des biomolécules sulfurées (Cys, glutathion) (fig. 7). Notons que le

glutathion peut être rangé dans la catégorie des molécules antioxydantes car il réagit très efficacement, grâce à sa fonction SH, avec l'oxygène singlet ou l'état triplet des photosensibilisateurs.

4. Conclusion

Le stress photooxydatif résulte presque toujours de réactions photosensibilisées produisant des espèces activées de l'oxygène (notamment l'oxygène singlet et des radicaux libres oxygénés). Une molécule photosensibilisatrice possédant une ou plusieurs bandes d'absorption dans

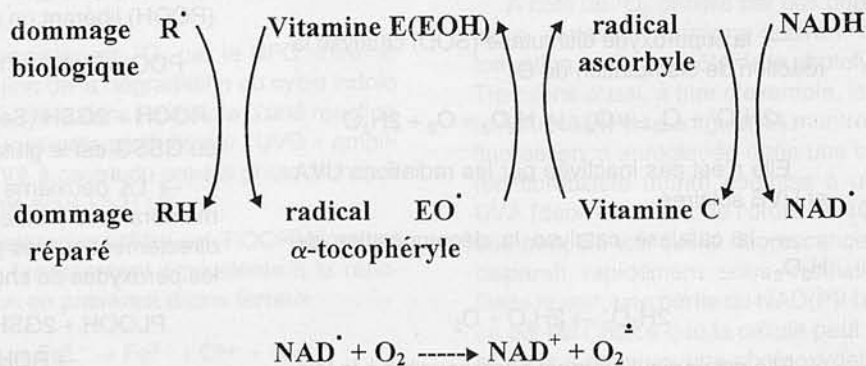


Figure 7
Chaîne réactionnelle montrant comment la réparation d'un radical biologique produit par un processus oxydatif ou photo-oxydatif conduit à la formation de l'ion superoxyde.

Reaction scheme showing how the repair of a biological radical induced by anoxidative or a photooxidative process leads to the formation of superoxide anion.

l'UVA absorbera aussi les radiations UVB du spectre solaire. Il en résulte que sous irradiation UVB, pourront coexister des réactions photochimiques directes affectant les bases pyrimidiques ou les résidus Trp des protéines et des réactions photosensibilisées qui permettront d'atteindre d'autres cibles comme les lipides insaturés et les vitamines. Notons aussi que les systèmes de détoxification des dommages photooxydatifs sont les mêmes que ceux rencontrés dans les phénomènes de « stress » oxydant classique.

Références bibliographiques

[1] SMITH K.C. The science of photobiology, *Plenum Press*, New York, 1989.

[2] FOOTE C.S. Photooxidation of biological model compounds. M.A.J. Rodgers and A.L. Powers eds., *Academic Press*, New York, 1981, 425-440.

[3] FRANKEL E.N. Chemistry of free radical and singlet oxydation of lipids, *Prog. Lipid. Res.*, 23, 1985, 197-221.

[4] MORLIÈRE P., MOYSAN A., GABORIAU F., SANTUS R., MAZIÈRE J.C. et DUBERTRET L. Ultraviolet A et peau. Implications d'espèces activées de l'oxygène. Tendances actuelles et résultats récents. *Path. Biol.*, 40, 2, 1992, 160-168.

Mots-clés :

Effets photodynamiques - Oxygène singulet - Radicaux libres - Antioxydants.

Photodynamic effects - Singlet oxygen - Free radicals - Antioxydants.

JOURNÉE D'ÉTUDE DU CITEPA

22 novembre 1994

à l'UNION INTERNATIONALE DES CHEMINS DE FER
16, rue Jean-Rey, 75015 PARIS

(avant-projet)

Le **CITEPA** propose pour cette journée, à laquelle nous inviterons, bien sûr, M. le Ministre de l'Environnement, un programme basé sur les actions internationales et nationales contre la pollution atmosphérique :

— les protocoles ou renouvellements dans le cadre de la Commission Economique pour l'Europe des Nations Unies (*Convention de Genève*) qui feront appel à la notion de charges critiques (retombées maximum que peuvent supporter les milieux récepteurs de SO₂, NOx) ;

— les actions en cours ou futures de l'Union Européenne : révision de la Directive sur les grandes installations de combustion, projet de directive sur les combustibles liquides, autres directives en préparation ;

— les actions de la France dans le cadre ci-dessus et les projets propres à notre pays.

Une deuxième partie présentera les moyens techniques à mettre en œuvre pour faire face à moyen et long terme aux exigences exprimées par les futures réglementations européennes et françaises, se traduisant par des réductions drastiques des émissions polluantes, et des rendements thermiques élevés qui iront dans le sens exigé par la lutte contre les risques liés à l'aggravation de l'effet de serre. Les réalisations et projets français seront décrits.