

LE STRESS OXYDANT

J. HALENG (1), J. PINCEMAIL (2), J.O. DEFRAIGNE (3), C. CHARLIER (4), J.P. CHAPPELLE (5)

RÉSUMÉ : Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les EOA au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides.

MOTS-CLÉS : *Stress oxydant - Antioxydants - Marqueurs biologiques*

OXIDATIVE STRESS

SUMMARY : Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant network, in favour of the former. Our lifestyle (smoking, alcoholism, obesity, intense physical exercise), but also our inadequate diet, contributes to significantly increase the production of ROS in our organism. This is potentially associated with an increased risk of developing ageing-related pathologies such as cardiovascular diseases and cancer. As a matter of prevention, it is necessary to have in hands a high technology allowing to correctly evidence the oxidative stress status of an individual in order to render optimal our antioxidant defences and to decrease the oxidative damages in DNA, proteins and lipids.

KEYWORDS : *Oxidative stress - Antioxidants - Biological markers*

INTRODUCTION

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, la superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants.

LES ESPÈCES OXYGÉNÉES ACTIVÉES

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP

(Adenosine TriPhosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales. D'une part, la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 molécules d'ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène. Par contre, dans les conditions physiologiques, environ 0,4 à 4 % d'électrons s'échappent, réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme et donnent naissance à des EOA. Celles-ci sont soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ($(O_2\cdot^-)$), ou le radical hydroxyle ($OH\cdot$), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (1).

Le rôle des EOA est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'EOA pour percer la paroi membranaire de l'ovule.

Le monoxyde d'azote radicalaire ou $NO\cdot$ est un composé important; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine. C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonc-

(1) Médecin-biologiste, Chef de Laboratoire Adjoint, (5) Professeur, Service de Chimie Médicale, CHU Sart Tilman, Liège.

(2) Collaborateur scientifique, (3) Professeur, Service de Chirurgie Cardio-Vasculaire, CHU Sart Tilman, Liège.

(4) Professeur, Service de Toxicologie clinique, CHU Sart Tilman, Liège.

tions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal,...) (2). Toutefois, le NO^\bullet peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques.

Formés en trop grande quantité, les EOA deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies.

PRINCIPALES CIBLES BIOLOGIQUES DES EOA

L'ACIDE DÉSORYBONUCLÉIQUE OU ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec OH^\bullet pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

LES PROTÉINES

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire.

LES LIPIDES MEMBRANAIRES

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène

pour former un radical peroxyde (ROO^\bullet), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (3).

Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonénal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues.

LES LIPOPROTÉINES

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (4). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (5).

LES DÉFENSES ANTIOXYDANTES

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Fig. 1). On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion

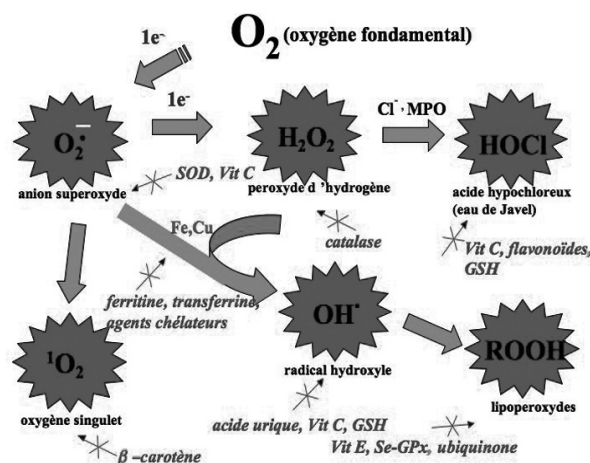


Figure 1 : Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA) et des antioxydants régulateurs de leur production

peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes.

SYSTÈMES DE DÉFENSE ENZYMATIQUES

Les superoxyde dismutases (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2\cdot^-$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD₁ cytosolique, la Mn-SOD₂ mitochondriale et la Cu/Zn-SOD₃, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD₃ est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine.

Les glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. Toutefois, pour un apport adéquat en sélénium, les teneurs en GPx atteignent un plateau. Le dosage en GPx ne peut donc être utilisé comme marqueur d'une intoxication en sélénium. Cependant, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs tels que l'insuffisance rénale ou la cytolysé hépatique peuvent modifier sa concentration.

Le système thiorédoxine

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif.

Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

SYSTÈMES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES

Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. L'apport recommandé journalier est d'environ 300 mg (agrumes).

La plupart des protéines dont l'albumine contiennent des groupements « thiols » qui possèdent des propriétés réductrices et piègent facilement les espèces oxygénées activées.

La vitamine C

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas de l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des EOA ($HO\cdot$ ou $O_2\cdot^-$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer.

La vitamine E

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement inté-

ressants, l' α - et le γ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes (ROO \cdot) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Si l' α -tocophérol est le plus abondant, il semble que le γ -tocophérol soit le plus efficace à ce niveau. Les apports journaliers d' α -tocophérol sont de l'ordre de 10 mg : il se retrouve en quantité variable dans les huiles (soja, maïs, olive) et dans les noix et noisettes. Le γ -tocophérol est présent essentiellement dans l'huile de sésame.

Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. De façon formelle, tous les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire (C₄₀H₅₆) avec de nombreuses doubles liaisons, le lycopène, pigment rouge présent notamment dans la tomate et le pamplemousse. Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A. Tous les caroténoïdes ne possèdent toutefois pas cette propriété particulière. Le β -carotène se retrouve dans l'abricot, le melon, la carotte, les légumes verts (épinards, laitue...) : l'apport journalier recommandé est de 1 à 5 mg.

Plusieurs études, dont l'étude YALTA (Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants), ont montré que l'effet bénéfique du β -carotène ne survenait qu'à des doses physiologiques ou alimentaires, alors qu'il est plutôt délétère à doses pharmacologiques, particulièrement chez le fumeur (6). Le tabagisme expose à des taux élevés d'EOA endogènes et exogènes et pourrait altérer le métabolisme de certains caroténoïdes, libérant des métabolites pro-carcinogènes.

Le Coenzyme Q₁₀

Le coenzyme Q₁₀, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. S'il n'existe pas d'apport journalier recommandé pour cet

antioxydant, il semble toutefois qu'il soit nécessaire d'en ingérer au moins 30 mg par jour.

Il est à noter que la synthèse de cet antioxydant est, en tout point, parallèle à celle du cholestérol. La formation de ces deux molécules dépend, en effet, de l'acide mévalonique formé à partir de la transformation de la HMG CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA) par la HMG-CoA réductase. Or, les agents hypocholestérolémiants comme les statines agissent en inhibant cette dernière enzyme, ce qui a comme effet secondaire une réduction significative du taux plasmatique d'ubiquinone. Connaissant le rôle de cette dernière au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, on comprend pourquoi les personnes prenant des statines se plaignent régulièrement de douleurs musculaires (7).

L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux (OH \cdot , ROO \cdot , NOO \cdot ...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). Les propriétés antioxydantes de l'urate *in vivo* peuvent être appréciées indirectement par le fait qu'un produit de réaction de l'urate avec les EOA, l'allantoïne, est présent à des taux élevés lors d'un stress oxydant.

La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Composée non hydro-soluble, elle se lie à l'albumine dans un rapport stœchiométrique 1/1, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger ROO \cdot et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.

Les polyphénols

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues

brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

LES OLIGOÉLÉMENTS

Le sélénium

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx.

La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...

Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) et peut – lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau.

Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'EOA induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg.

TABLEAU I : SOURCES DE STRESS OXYDANT ENDOGÈNES ET EXOGENES

<p>Mode de vie</p> <ul style="list-style-type: none"> Tabagisme Faible consommation en fruits et légumes Alcool Médicaments Pilule contraceptive Exposition au soleil Exercice intense ou mal géré
<p>Environnement</p> <ul style="list-style-type: none"> Pollution Ozone Amiante Radiations Contacts avec des substances cancérigènes
<p>Mécanismes biochimiques</p> <ul style="list-style-type: none"> Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation Altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer Oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondriales Biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (Circulation extra-corporelle, transplantations)

LE STRESS OXYDANT ET LES FACTEURS LE FAVORISANT

Dans des conditions physiologiques, la production des EOA est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme : la balance anti-oxydants / pro-oxydants est en équilibre. Le stress oxydant résultera d'une situation où l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans le développement du vieillissement ou de pathologies associées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète, dégénérescence maculaire, asthme, ...). Comme le montre le tableau I, les sources de stress oxydant peuvent avoir diverses origines endogènes et exogènes.

UNE PATHOLOGIE ASSOCIÉE AU STRESS OXYDANT : LE DIABÈTE

De nombreuses pathologies, impliquant le stress oxydant dans leur développement, ont été recensées. Outre les maladies cardio-vasculaires (oxydation des lipides) et le cancer (oxydation de l'ADN), c'est certainement dans le cadre du diabète (obésité, syndrome métabolique) que des avancées spectaculaires ont été réalisées au cours des dernières années.

Plusieurs mécanismes pathogéniques conduisent à une augmentation du stress oxydant et semblent impliqués dans l'apparition des complications du diabète (8, 9).

L'ACTIVATION DE LA VOIE DES POLYOLS

En situation d'hyperglycémie, l'hexokinase qui permet la phosphorylation du glucose et son utilisation dans les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates est saturée. En conséquence, le glucose est transformé en sorbitol puis en fructose, respectivement sous l'action de l'aldose réductase et de la sorbitol déshydrogénase. Suite à ces réactions, le rapport NADH/NAD⁺ s'élève, entraînant une inhibition de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et une accentuation de la formation de produits terminaux de glycation (AGE). En outre, les taux cellulaires de NADPH (Nicotinamide Dinucléotide Phosphate réduit), coenzyme nécessaire à l'activité de la glutathion réductase (régénération du GSH) ainsi qu'à l'activité de l'ascorbate réductase et de la NO-synthase, diminuent, avec pour conséquence une diminution des capacités antioxydantes.

LA PRODUCTION DE PRODUITS TERMINAUX DE GLYCATION (AGE)

Le glucose réagit facilement avec les groupes amines libres des protéines pour former des «produits d'Amadori». Ces derniers sont relativement instables et se dégradent en produits avancés de la glycation (AGE) ou produits de Maillard (10). Des recherches récentes ont montré que les AGE, retrouvés en concentrations élevées dans la rétine et les glomérules rénaux, jouent un rôle important dans le développement des complications du diabète.

Les AGE plasmatiques peuvent se lier à des récepteurs (RAGE) présents sur les cellules endothéliales, glomérulaires et les macrophages. L'activation de ces récepteurs déclenche une production d'EOA et active le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa-B), modifiant la transcription génique. La liaison des AGE aux RAGE endothéliaux semble, en partie, responsable de l'hyperperméabilité capillaire observée au cours du diabète, via la production de NO^{*} (11).

Parmi les AGE figure la pentosidine, résultant de la réaction de pentoses avec les protéines. Sa concentration s'élève avec l'âge, dans le diabète (12) et dans les maladies rénales au stade terminal. Toutefois, elle est aussi augmentée dans l'arthrite rhumatoïde (13) ou le lupus érythémateux disséminé, en absence d'hyperglycémie ou

de maladie rénale. A ce titre, la pentosidine n'est pas un simple marqueur de glycosylation dans le diabète, mais elle pourrait être utilisée comme marqueur plus général de stress oxydant dans d'autres pathologies. Il serait intéressant d'étudier sa présence ainsi que celle d'autres produits AGE dans diverses maladies afin de valider leur implication dans les complications du diabète.

En réponse à cette élévation, des travaux récents ont montré que la concentration plasmatique des RAGE était, par exemple, nettement diminuée chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (14).

L'AUTO-OXYDATION DU GLUCOSE

En présence de fer, le glucose s'oxyde, entraînant la génération d'EOA, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML). Ce groupement capte facilement le cuivre, ce qui provoque le déclenchement de réactions de type Fenton avec production de radicaux libres : il s'ensuit une augmentation de la peroxydation lipidique (15). Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardio-vasculaires.

L'ACTIVATION DE LA PROTÉINE KINASE C (PKC)

L'hyperglycémie intracellulaire entraîne l'activation de la PKC, contribuant ainsi aux anomalies des flux sanguins locaux, consécutives à la diminution de NO^{*} et/ou la libération d'endothéline-1.

COMMENT METTRE EN ÉVIDENCE UN ÉTAT DE STRESS OXYDANT ?

La mise en évidence du stress oxydant chez un individu fait l'objet de recherches intenses au sein du CHU de Liège et ce, depuis de nombreuses années (16). Le stress oxydant implique un ensemble complexe de paramètres et ne peut donc être mis en évidence par une seule méthode, aussi élaborée soit-elle (17). Le tableau II reprend une liste des différents marqueurs qui se réalisent en routine clinique, moyennant un traitement pré-analytique rigoureux de l'échantillon (centrifugation immédiate, congélation à -20°C ou moins).

Ces marqueurs se répartissent selon quatre axes :

- 1) la détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques;
- 2) le dosage des oligo-éléments;

TABLEAU II : ANTIOXYDANTS ET MARQUEURS D'OXYDATION DE TABLEAU

Marqueurs	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence CHU-Liège	
ANTIOXYDANTS			
vitamine C	piégeur de radicaux libres marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies	H : 8,6 à 18,83 F : 6,21 à 15,18	µg / ml µg / ml
α - tocophérol	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)	8 à 15	mg / litre
γ - tocophérol	valeur plasmatique basse plus prédictive que l'α - tocophérol dans la survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate	0,28 à 2,42	mg / litre
vitamine A	piégeur de radicaux libres implication dans la vision	1200 à 3700	UI / litre
β - carotène	marqueur de la consommation de légumes piégeur de l'oxygène singulet (--> photoprotecteur) inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense	0,05 à 0,68	mg / litre
glutathion réduit glutathion oxydé rapport GSH/GSSG	marqueur de la présence d'un stress oxydant action de synergie avec la vitamine C et l'α - tocophérol	717 à 1110 1,17 à 5,32 156 à 705	µMol/litre µMol/litre
capacité antioxydante totale (Test ORAC)	test global de screening (ne peut être interprété seul) (plasma non déprotéinisé)	11 000 - 16 000 Equiv Trolox	µM
ubiquinone	inhibiteur de la peroxydation lipidique implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale	0,3 à 1,39	mg / litre
acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres reflet de la présence de phénomènes d'ischémie - reperfusion	H < 70 F < 60	mg / litre mg / litre
vitamines B6, B9 et B12	régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine implication dans la synthèse de l'ubiquinone	B9 : 2,2 à 17,5 B12 > 200	ng / ml pg / ml
superoxyde dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570	UI / g Hb
glutathion peroxydase (GPx)	élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques reflet d'une adaptation au stress oxydant facteur de risque cardiovasculaire	H : 20-56 F : 26-58	UI / g Hb UI / g Hb

OLIGOELEMENTS			
sélénium	co - facteur des différentes GPx rôle dans l'immunité	94-130	µg / litre
cuivre	co - facteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration H : 0,7-1,40	F : 0,8-1,55	mg / litre
zinc	co - facteur de la SOD inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre-rôle dans l'immunité	0,7-1,20	mg / litre
rapport Cu/Zn	marqueur de la présence d'un stress oxydant corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques	1 - 1,17	
MARQUEURS d'OXYDATION			
peroxydes lipidiques	marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides implication dans le développement de l'athérosclérose	10-400	µMol / litre
LDL oxydées	facteur de risque cardiovasculaire (LDL petites et denses plus susceptibles à l'oxydation)	< 500	ng / ml
anticorps contre les LDL oxydées	réponse de l'organisme à la production de LDL oxydées facteur de risque cardiovasculaire	200-600	UI / litre
isoprostanes	marqueur spécifique de la peroxydation lipidique	en développement	
8 hydroxy - déoxyguanosine	marqueur d'oxydation de l'ADN facteur de risque de développement de cancer	0-16 0-20	µg / litre µg / g créatinine
protéasome	système de régulation des protéines oxydées sensible à la production des radicaux libres		
Advanced Glycated Endproducts (AGE) (pentosidine) et récepteurs des AGE	marqueur de la glycolisation des protéines dans le diabète, l'athérosclérose, les maladies rénales et l'arthrite rhumatoïde		
SOURCES d'OXYDATION			
fer libre	fer toxique conduisant à une augmentation accrue de radicaux libres	0	
fer sérique	surcharge en fer	H 8-33, F 6-31	µMol/litre
ferritine		H 30-400, F 15-150	ng/ml
coefficient de saturation en fer de la transferrine		H 0,2-0,4 , F 0,2-0,5	
homocystéine	facteur de risque cardiovasculaire indépendant du cholestérol contribue à l'oxydation des LDL	< 60 ans : 5-15 > 60 ans : 5-20	µMol / litre µMol / litre
myéloperoxydase	marqueur de l'inflammation (source de production de radicaux libres) facteur de risque cardiovasculaire	10 à 75	ng / ml
glucose	amplifie la peroxydation lipidique implication dans la glycation des protéines	0,6-1,1	g / litre

3) la mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines;

4) l'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie).

Parmi tous ces paramètres, pointons quelques analyses intéressantes :

- Le rapport vitamine C / α -tocophérol : ces deux antioxydants agissent en synergie et la valeur optimale du rapport doit être supérieure à 1,3. Des valeurs inférieures sont clairement associées avec un risque accru de développer des maladies cardio-vasculaires (18).

- Le rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) est un excellent marqueur du stress oxydant et de son importance. En effet, le GSH réagit très rapidement avec les EOA pour former le GSSG ; plus la valeur de ce rapport est basse, plus le stress oxydant est élevé.

- Le rapport Cu/Zn : à concentration élevée, le cuivre devient pro-oxydant et favorise la formation des EOA. A l'opposé, le zinc inhibe les réactions radicalaires induites par le cuivre. La mesure du rapport plasmatique Cu/Zn est donc un excellent marqueur du stress oxydant. De plus, il existe une corrélation positive étroite entre la valeur de ce rapport et le taux circulant de peroxydes lipidiques (19).

- Les isoprostanes : ils résultent spécifiquement de l'attaque des radicaux libres oxygénés sur l'acide arachidonique et ils sont des marqueurs terminaux stables de la peroxydation lipidique («gold standard technique»). Ils sont stables *in vivo* et *in vitro* (20) ; ils peuvent être dosés à des concentrations picomolaires (GC/MS), mais il faut une extraction et un appareillage spécifiques; ils ne sont pas affectés par l'alimentation. Par ailleurs, leur formation *in vivo* est corrélée à l'importance du stress. L'étude CARDIA, réalisée chez 2.850 jeunes adultes, a montré la présence de calcifications des artères coronaires chez 10% des sujets (21). Les taux plasmatiques de F2-isoprostanes étaient corrélés à la présence de calcifications des artères coronaires, confirmant ainsi que la peroxydation lipidique pourrait avoir un rôle initiateur dans le développement précoce de la plaque d'athérome (22). Il est à noter que ce marqueur est de loin beaucoup plus spécifique de la peroxydation lipidique que le classique dosage (et malheureusement toujours utilisé) de la malondialdéhyde par la méthode des TBARS.

- Les LDL oxydées et les anticorps anti-LDL oxydées : il existe une relation étroite entre l'élévation des taux plasmatiques de ces marqueurs et la progression de l'athérosclérose (23). Des

études ont montré que les taux plasmatiques de LDL oxydées sont élevés chez les patients présentant un syndrome métabolique ou des troubles cardio-vasculaires (angor instable, infarctus du myocarde) (24, 25). De même, l'instabilité de la plaque d'athérome est liée à l'accumulation intrinsèque de LDL oxydées (26).

- La 8-OH-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) : ce métabolite résulte de l'action d'EOA sur la guanine et son dosage urinaire correspond à une évaluation globale des dommages oxydatifs du DNA (27).

- Les A.O.P.P. ou «Advanced Oxidised Protein Products» : les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines sont la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés. Des taux élevés de protéines oxydées ont été observés dans le liquide synovial et le plasma de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (28).

- La myéloperoxydase ou MPO : c'est un marqueur de l'activation des granulocytes et il joue un rôle fondamental dans les processus de défense de l'organisme, via la production d'acide hypochloreux (HOCl). Des études récentes ont montré que la MPO serait un marqueur potentiel de l'athérosclérose. Les individus déficitaires en MPO présenteraient moins de maladies cardio-vasculaires alors qu'une élévation des taux de MPO serait associée avec un risque plus élevé de maladie coronarienne. Une MPO > 350 μ g/litre permettrait d'identifier les personnes à risque d'infarctus du myocarde dans une période de 1 à 6 mois avant l'attaque (29).

- La C-Réactive Protéine ou CRP : c'est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, synthétisée dans le foie et régulée par des cytokines, principalement l'IL-6 et le TNF-alpha. L'inflammation participe à la pathogénie de l'athérosclérose dès les stades les plus précoces et pourrait influencer la survenue de syndromes coronaires aigus.

- Le statut en fer de l'organisme : le fer est indispensable à la vie, il joue un rôle important dans le transport de l'oxygène, le transfert des électrons et la catalyse enzymatique. A l'état libre, ce Fe^{2+} est un puissant donneur d'électrons, réagissant notamment avec l'eau oxygénée, pour générer des radicaux hydroxyles hautement réactifs (réaction de Fenton).

Dans les conditions physiologiques, la transferrine possède une capacité importante de fixation du fer puisqu'elle est saturée à 30% environ. En situations pathologiques, le fer peut être libéré de ses protéines de transport (ferritine, lactoferrine) sous l'action des EOA et se

retrouver dans le sang sous forme libre, capable d'initier des réactions radicalaires.

Le dosage du fer, de la transferrine et de sa saturation donnera une indication sur l'état de stress oxydant du patient.

- L'homocystéine : son élévation est un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant.

L'hyperhomocystéinémie altère le phénotype antithrombotique physiologique des cellules endothéliales, démasque leur potentiel pro-coagulant et perturbe les mécanismes de production de NO[•] endothélial. L'auto-oxydation de l'homocystéine produit des EOA qui stimulent la peroxydation lipidique et la production d'AOPP et de dérivés AGE, athérogènes (30).

- La capacité antioxydante totale du plasma : il s'agit d'une méthode de mesure globale qui consiste à évaluer l'effet inhibiteur des antioxydants plasmatiques sur une réaction radicalaire induite *in vitro*. De très nombreux tests ont été proposés, mais la vérité oblige à dire qu'ils sont relativement peu spécifiques. Une méthode émergente semble être le test ORAC («Oxygen Radical Antioxidant Capacity»), mais il est absolument impératif de corréliser sa mesure avec celle des protéines totales et de l'acide urique pour interpréter correctement les données. Ceci est vrai pour toutes les autres méthodes proposées dans ce domaine (31).

CONCLUSION

Radicaux libres, stress oxydant, espèces oxygénées activées, antioxydants sont devenus des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même le grand public. Le milieu médical prend conscience qu'une augmentation de stress oxydant chez un individu est potentiellement une cause d'apparition de diverses pathologies comme les maladies cardio-vasculaires, le cancer ou le diabète sucré. Pour se prémunir contre ces pathologies, il est important de disposer de défenses antioxydantes adéquates qui doivent nous être apportées par une alimentation saine, particulièrement riche en fruits et légumes (32). Actuellement, il existe un réel *consensus* scientifique sur le fait que, plus le statut en antioxydants d'un individu est bas, plus le risque de développer ces pathologies est élevé. Récemment, des avancées spectaculaires ont été réalisées sur l'implication du stress oxydant dans le développement du diabète et des complications qui lui sont associées. Tout ceci a requis et requiert encore la mise au point de méthodes et d'outils performants permettant d'évaluer, le plus correctement possible, le sta-

tut de stress oxydant chez un individu (33). Ceci repose impérativement sur un traitement particulièrement soigneux des échantillons sanguins, qui ne peut se réaliser que dans des laboratoires spécialisés dans le domaine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D.— *Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 2005, 547 pages.
2. Hare J.— Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 2004, **351**, 2112-2114.
3. Atkin MA, Gasper A, Ullegaddi R, et al.— Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 2005, **51**, 2138-2144.
4. Nakajima K, Nakano T, Tanaka A.— The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 2006, **367**, 36-47.
5. Saad A, Virella G, Chassereau Ch, et al.— OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 2006, **47**, 1975-1983.
6. Hozawa A, Jacobs D, Steffes M, et al.— Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction : the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *Clin Chem*, 2007, **53**, 1-9.
7. Langsjoen PH, Langsjoen AM.— The clinical use of HMG CoA - reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10 - A review of animal and human publications. *Biofactors*, 2003, **18**, 101-111.
8. Defraigne J-O.— Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète ? *Rev Med Liege*, 2005, **60**, 472-478.
9. Vincent HK, Taylor AG.— Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obesity*, 2006, **30**, 400-418.
10. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V.— Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an *in vitro* study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 2006, **366**, 190-195.
11. Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, et al.— Diabetic vascular disease : it's all the RAGE. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7**, 1588-1600.
12. Wautier J-L.— Récepteurs des produits de glycation avancée et diabète sucré. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 1997, **9**, 637-641.
13. Rodríguez-García J, Requena J, Rodríguez-Segade S.— Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin.Chem*, 1998, **44**, 250-255.
14. Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A.— Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Therapy*, 2005, **7**, 817-824.

15. Devaraj S, Hirany Sh, Burk R, et al.— Divergence between LDL oxidative susceptibility and urinary F2-isoprostanes as measures of oxidative stress in type 2 diabetes. *Clin Chem*, 2001, **47**, 1974-1979.
16. Pincemail J, Defraigne JO, Limet R.— Oxidative stress in clinical situations - fact or fiction ? *Eur J Anaesthesiol*, 1996, **13**, 219-234.
17. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, et al.— Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 2006, **52**, 601-623.
18. Gey KF.— Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*, 1998, **7**, 113-174.
19. Pincemail J, Vanbelle S, Gaspard U, et al.— Relationship between oxidative stress and the taking of oral contraceptives in women aged 40-48 years. *Human Reprod*, 2007, in press.
20. Tsimikas S.— Measures of oxidative stress. *Clin Lab Med*, 2006, **26**, 571-590.
21. Gross M, Steffes M, Jacobs D, et al.— Plasma F2-isoprostanes and coronary artery calcification : The CARDIA Study. *Clin Chem*, 2005, **51**, 125-131.
22. Young IS.— Oxidative stress and vascular disease : insights from isoprostane measurement. *Clin Chem*, 2005, **51**, 14-15.
23. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, et al.— Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005, **353**, 46-57.
24. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, et al.— The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes*, 2004, **53**, 1068-1073.
25. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, et al.— Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*, 1998, **98**, 1487-1494.
26. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al.— Oxidized LDL in carotid plaque and plasma associates with plaque instability. *Arterioscl Thromb Vasc Surg*, 2002, **22**, 1649-1659.
27. Chen Ch, Qu L, Li B, et al.— Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin Chem*, 2005, **51**, 759-767.
28. Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux, et al.— Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clin Chim Acta*, 2006, **372**, 147-153.
29. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al.— Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003, **108**, 1440-1445.
30. David J-L.— L'hyperhomocystéimémie, facteur de risque thrombo-embolique veineux. *Louvain Medical*, 2000, **119**, 191-196.
31. Guohua Cao, Ronald L.— Prior Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*, 1998, **44**, 1309-1315.
32. Pincemail J, Degrune F, Voussure S, et al.— Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clin Metab*, 2007, **21**, 66-75. .
33. Rabovsky A, Cuomo J, Eich N.— Measurement of plasma antioxidant reserve after supplementation with various antioxidants in healthy subjects. *Clin Chim Acta*, 2006, **371**, 55-60.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J.P. Chapelle, Service de Biologie clinique, CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.