

Évaluation des concentrations plasmatiques en anti-oxydants, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine dans un échantillon de la population liégeoise

Annales de Biologie Clinique. Volume 58, Numéro 2, 177-85, Mars - Avril 2000, Articles originaux

■ **Résumé**  **Summary**

Auteur(s) : J. Pincemail, J. Siquet, J.-P. Chapelle, J.-P. Cheramy-Bien, G. Paulissen, A.-M. Chantillon, G. Christiaens, J. Gielen, R. Limet, J.-O. Defraigne, Département de chirurgie cardiovasculaire, CHU et Credec, B35, Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.

Résumé : Plusieurs études épidémiologiques et cliniques suggèrent que le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires. Dans cette optique, les valeurs de référence suivantes en anti-oxydants plasmatiques ont été déterminées dans un groupe de 123 donneurs de sang (94 hommes, 29 femmes, âge 21-64 ans) vivant dans la région de Liège en Belgique : vitamine A (1,5-3,62 mmol/l), vitamine C (3,68-75,21 mmol/l), vitamine E (16,98-46,46 mmol/l), rapport vitamine E/cholestérol (3,92-8,32 mmol/mmol), sélénium (0,66-1,26 mmol/l), protéines à groupement sulphydryl (216-556 mmol/l), acide urique (174-477 mmol/l), superoxyde dismutase (542-852 UI/g d'hémoglobine), glutathion peroxydase (39,55-91,83 UI/g d'hémoglobine). Des états de carence en anti-oxydants sont pratiquement inexistantes au sein de cette population en bonne santé, mais des concentrations considérées comme basses se retrouvent toutefois dans 16,2 % de la population pour la vitamine C (< 11,35 mmol/l : 5,69 %) et le sélénium (< 0,75 mmol/l : 10,5 %). Les anticorps dirigés contre les LDL oxydées comme marqueur de stress oxydatif ainsi que l'homocystéine, un facteur de risque de l'athérosclérose pouvant être impliqué dans le développement du stress oxydatif, ont été analysés. Près de 40 % de la population présentent des concentrations sanguines en l'un de ces deux facteurs de risques cardiovasculaires plus élevées que la valeur moyenne limite supérieure (20,3 % > 650 UI/l pour les anticorps et 19,5 % > 15,28 mmol/l pour l'homocystéine), sans qu'il y ait toutefois de corrélation avec l'âge ou de faibles valeurs en anti-oxydants. Le tabagisme (25 % de la population) se traduit par une diminution significative de 31, 9 et 13 % des concentrations de vitamine C, sélénium et de glutathion peroxydase. Les sujets consommant entre 1 et 4 fruits par jour ont des concentrations en vitamine C significativement plus élevées de 56,9 % par rapport à ceux ne prenant jamais aucun fruit (26,8 % de la population). En revanche, les concentrations d'homocystéine sont diminuées significativement de 21,4 % chez les grands consommateurs de fruits. En conclusion, grâce au développement d'analyses qui permettent le dosage de tous ces paramètres en routine, les médecins peuvent désormais établir facilement l'état de stress oxydatif de leur patient et, en fonction du bilan obtenu, cibler des populations à risque de développer des maladies cardiovasculaires.

Mots-clés : Antioxydants – LDL oxydées – Homocystéine.

Illustrations

ARTICLE

Les maladies cardiovasculaires constituent, avec le cancer, l'une des deux causes majeures de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés en général, et en Belgique tout particulièrement. Ces maladies sont également à l'origine d'une lourde morbidité, responsable de nombreuses limitations fonctionnelles et d'invalidité, non seulement chez les plus de 65 ans, mais aussi dans la population économiquement productive. Plusieurs études expérimentales, épidémiologiques et cliniques supportent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement des maladies cardiovasculaires [1]. En termes de prévention, il devient donc primordial de sensibiliser le médecin généraliste, en première ligne avec les patients, au fait qu'il est actuellement aisé d'obtenir des informations sur l'état de stress oxydatif d'un individu.

Le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les anti-

oxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. La réduction univalente de l'oxygène se traduit par la formation d'espèces oxygénées activées (EOA) dont font partie les radicaux libres (anion superoxyde, radical hydroxyle), le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet. Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des enzymes, modifier les structures primaires et secondaires des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec, comme conséquence, une altération du message génétique, une dégradation des sucres, une oxydation des lipoprotéines et l'initiation des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés. Il est toutefois bon de rappeler que les EOA sont produites en permanence par notre organisme et que, dans certains cas, elles peuvent jouer un rôle physiologique. Cette production naturelle est toutefois parfaitement régulée par notre organisme qui a développé des moyens de protection. Ceux-ci se divisent en un système de défense primaire composé d'enzymes (les superoxydes dismutases Cu-Zn et Mn, la catalase, les glutathion peroxydases, le couple thiorédoxine-thiorédoxine réductase), de molécules anti-oxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, le groupe des vitamines A, C, E, caroténoïdes, ubiquinone) et d'oligoéléments (sélénium, zinc) et un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule de protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques [2].

Dans certaines situations pathologiques, une surproduction d'EOA due à l'activation de divers mécanismes biochimiques peut submerger rapidement toutes les défenses anti-oxydantes. C'est le stress oxydatif qui est impliqué, parmi d'autres mécanismes, dans le développement de l'athérosclérose [3], une maladie systémique des artères larges et moyennes se caractérisant par le durcissement et la perte d'élasticité de la paroi artérielle ainsi qu'un rétrécissement de la lumière artérielle. L'oxydation des lipoprotéines de basse densité (*low density lipoproteins* ou LDL), très riches en cholestérol, est actuellement au centre de la théorie lipidique de l'athérosclérose. Ces LDL, petites et denses, passent dans l'espace sous-endothélial où elles sont oxydées par les espèces oxygénées activées. Après de multiples réactions, elles transforment les macrophages, attirées par chimiotactisme dans l'espace sous-endothélial, en cellules spumeuses, base de la lésion d'athérosclérose.

Des études épidémiologiques importantes ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la prévalence de la maladie coronarienne, en particulier de l'athérosclérose, et des apports alimentaires et/ou des concentrations sanguines faibles en anti-oxydants [4]. En Belgique, il n'existe toutefois que peu de données relatives aux valeurs de référence de chaque anti-oxydant ou de marqueurs de stress oxydatif permettant de cibler des populations à risque où d'éventuels déficits en anti-oxydants pourraient être corrigés soit par des conseils diététiques, soit par des apports supplémentaires en anti-oxydants et minéraux. La présente étude a consisté, dans un échantillon d'individus présumés en bonne santé vivant dans la région de Liège (Belgique), en la mesure de la plupart

des anti-oxydants, des anticorps dirigés contre les LDL oxydées, comme marqueur du stress oxydatif, et de l'homocystéine, facteur de risque de l'athérosclérose, considéré récemment comme pouvant être impliqué dans le développement du stress oxydatif.

Matériel et méthodes

Sujets

Une population de 123 personnes (94 hommes, 29 femmes) en bonne santé d'une moyenne d'âge de 47,9 ± 9,7 ans (21-64 ans) a été sélectionnée parmi les donneurs de sang du centre de transfusion sanguine du CHU de Liège (Belgique). Tous les sujets ont été informés du but de l'étude par les responsables légaux et ont signé un consentement écrit avant leur participation à l'étude.

Méthodes

Dès l'arrivée des sujets à jeun au centre de transfusion, deux tubes de 10 ml de sang veineux sont prélevés sur EDTA et conservés sur glace. Dans les 10 min qui suivent, un tube est centrifugé à 1 500 g pendant 15 min. Le plasma est aliquoté et conservé à - 80 °C jusqu'à l'analyse des différents paramètres biochimiques. Vu son grand caractère labile, la vitamine C est immédiatement dosée par une méthode spectrophotométrique (réduction du 2,6-dichlorophénolindophénol ; Perkin-Elmer Lambda 40) après stabilisation du plasma avec de l'acide métaphosphorique à 10 % [5]. Les vitamines A et E sont déterminées simultanément par une méthode HPLC avec détection UV utilisant des réactifs et des colonnes de chromatographie Bio-Rad (coffret 195-5869). La vitamine E (Vit E) étant transportée par les lipides, le statut de cette vitamine anti-oxydante est exprimé sous la forme du rapport vitamine E/cholestérol. Ce dernier est dosé par une méthode enzymatique à la cholestérol oxydase [6]. Le sélénium a été mesuré par spectrométrie d'absorption atomique avec four graphite et correction de bruit de fond par effet Zeeman (Varian Spectr-AA-640) [7]. Les protéines à groupement sulphydryl (PSH) ont été évaluées immédiatement après la centrifugation de l'échantillon par une méthode spectrophotométrique utilisant la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) [8]. Les concentrations en anticorps contre les LDL oxydées sont déterminées par une méthode immunologique enzymatique standardisée commercialisée par Biomedica Gruppe (Vienne, Autriche). Des LDL oxydées par le Cu²⁺ sont utilisées comme antigènes et fixées sur une plaque à 96 puits. Les anticorps présents dans le plasma se fixent spécifiquement sur l'antigène. Après une étape de lavage, une peroxydase spécifique conjuguée à des anticorps IgG humains met en évidence la présence des anticorps fixés. Après un second lavage, de la tétraméthylbenzidine est ajoutée dans chaque puit comme substrat chromogénique [3]. L'analyse de l'absorbance (450 nm) se fait à l'aide d'un lecteur de plaque Multiscan IEMS (Labsystems, Finlande). L'homocystéine totale (tHcy) est mesurée par une méthode HPLC couplée à la détection par fluorescence selon la technique décrite par Jacob *et al.* [9].

Dans l'autre échantillon sanguin, la détermination des enzymes superoxyde dismutase (SOD) et glutathion

peroxydase (GPx) s'est faite sur le sang total à l'aide de kits d'analyses commercialisés par Randox (Antrim, Grande-Bretagne). Les valeurs sont exprimées en unités internationales par gramme d'hémoglobine déterminée par une méthode spectrophotométrique au cyanate de potassium.

Analyse statistique

Lorsque la loi normale de distribution est correctement suivie, les valeurs de référence pour le paramètre étudié ont été définies comme étant les valeurs moyennes \pm deux fois la déviation standard (DS) qui ont été obtenues à partir d'histogrammes de fréquences absolues après divisions de classe (distribution gaussienne optimisée par itérations successives). Les différences entre concentrations moyennes pour les différents sous-groupes (fumeurs, mangeurs de fruits) ont été évaluées par le test t de Student pour variables indépendantes. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme étant statistiquement significatives. Les corrélations ont été calculées par la méthode de la régression multiple entre les diverses variables aléatoires.

Résultats

La loi normale de distribution est correctement suivie pour tous les anti-oxydants étudiés. Le [tableau 1](#) reprend les concentrations moyennes, déviations standards ainsi que les valeurs de référence calculées pour les vitamines A, C, E, le rapport vitamine E/cholestérol, le sélénium, le PSH, l'acide urique ainsi que les enzymes anti-oxydantes GPx et SOD. Les concentrations moyennes en vitamine C sont significativement plus élevées chez les femmes que chez les hommes ($52,95 \pm 23,86$ versus $39,43 \pm 21,31$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,0001$) tandis que c'est l'inverse pour la SOD ($666,8 \pm 72,5$ versus $710,5 \pm 94,5$ UI/g d'hémoglobine ; $p < 0,05$) et l'acide urique ($265,72 \pm 89,83$ versus $334,37 \pm 73,78$ $\mu\text{mol/l}$). Pour les autres paramètres, aucune différence significative entre les sexes n'a été trouvée (observations non montrées).

La [figure 1](#) montre que la distribution est légèrement dissymétrique pour les concentrations d'anticorps contre les LDL oxydées et que la concentration moyenne \pm DS est de $424,19 \pm 231,26$ UI/l. Aucune différence significative dans les concentrations moyennes d'anticorps n'est observée entre les hommes et les femmes. Des valeurs supérieures à 650 UI/l (valeur limite supérieure) sont relevées chez 19,5 % des sujets (valeur la plus élevée : 1 580 UI/l). Pour l'homocystéine, la loi de distribution est aussi légèrement dissymétrique dans les basses valeurs comme le montre la [figure 2](#). La valeur moyenne \pm DS est de $11,71 \pm 3,58$ $\mu\text{mol/l}$. Les femmes présentent une concentration d'homocystéine significativement supérieure à celle des hommes ($12,92 \pm 4,91$ versus $10,60 \pm 3,68$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) ; 19,5 % des sujets présentent des concentrations comprises entre 15 et 30 $\mu\text{mol/l}$ et un seul dépasse le seuil de 30 $\mu\text{mol/l}$.

L'analyse de régression montre que des corrélations inverses faibles mais significatives avec l'âge apparaissent uniquement pour la vitamine C ($r^2 = 0,042$; $p = 0,021$) et la vitamine E ($r^2 = 0,063$; $p = 0,005$) tandis qu'il existe une corrélation positive entre âge et cholestérol ($r^2 = 0,10$; $p = 0,0003$). Les [figures 3 et 4](#)

montrent qu'il n'y a pas d'influence de l'âge sur les concentrations d'anticorps contre les LDL oxydées et d'homocystéine. De plus, aucune corrélation n'est observée entre ces deux facteurs de risque d'accidents cardiovasculaires et les anti-oxydants ainsi qu'avec le cholestérol ou le LDL-cholestérol.

Le [tableau 2](#) montre l'influence du tabagisme (25 % des sujets fumant entre 5 et 20 cigarettes par jour) sur tous les paramètres étudiés dans cette étude. Chez les fumeurs, la concentration moyenne en vitamine C diminue significativement de 31 % par rapport aux non fumeurs. Les concentrations en sélénium et en GPx sont également significativement affectées à la baisse mais dans une moindre mesure (respectivement 9 et 13 %). Chez les fumeurs, il apparaît également que les valeurs en anticorps contre les LDL oxydées sont plus basses que chez les non-fumeurs, mais sans toutefois atteindre une différence significative. Les fumeurs ont également une concentration moyenne de tHcy plus élevée de 13,5 % par rapport aux non-fumeurs, avec cette fois une différence à la limite de la signification statistique ($p = 0,066$).

Les sujets ont répondu à un questionnaire portant sur la consommation de fruits (voir répartition dans le [tableau 3](#)) ainsi que la prise d'anti-oxydants. Le [tableau 3](#) indique que les sujets consommant entre un et plusieurs fruits par jour ont une concentration moyenne en vitamine C significativement plus élevée de 56,9 % ($p < 0,0002$) et 33,9 % ($p < 0,05$) respectivement par rapport aux personnes ne consommant aucun fruit ou de manière modérée (3-4 fruits par semaine). Parmi tous les autres paramètres biochimiques, seules les concentrations en PSH, de sélénium et en GPx sont également augmentées chez les grands consommateurs de fruits. En revanche, l'absorption régulière de fruits se traduit par une diminution significative des concentrations moyennes en tHcy comme l'indique le [tableau 3](#). Moins de 5 % des sujets ont déclaré avoir pris des complexes vitaminés depuis au moins un semaine. Les effets se font essentiellement ressentir au niveau de la vitamine C puisque ces sujets présentent une concentration moyenne en cet anti-oxydant de 50,82 $\mu\text{mol/l}$, soit une valeur 1,29 fois plus élevée que la concentration moyenne observée pour l'ensemble des sujets (39,40 $\mu\text{mol/l}$).

Discussion

À notre connaissance, aucune étude visant à établir l'état de stress oxydatif d'un individu aussi bien dans des échantillons de populations situées dans le Nord ou le Sud de la Belgique n'a été réalisée à ce jour. Une comparaison valable avec d'autres études belges peut être faite au niveau national uniquement pour le sélénium. Dans un travail datant de 1989 et portant sur une population bruxelloise de 145 sujets âgés de 20 à 79 ans, Nève *et al.* [10] ont déterminé une valeur moyenne plasmatique \pm DS en sélénium de $1,06 \pm 0,15$ $\mu\text{mol/l}$ qui était plus faible que celles trouvées dans d'autres échantillons de populations vivant dans la partie nord du pays. À l'époque, les auteurs concluaient qu'une modification quantitative ou qualitative de l'apport alimentaire pouvait être à l'origine de cette baisse. Même si des réserves dues aux possibilités de variation géographique peuvent être prises en considération, nous confirmons dix ans plus tard avec une valeur

plasmatique de $0,96 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$ que la concentration moyenne en sélénium continue effectivement à baisser en Belgique. Cette valeur est également plus basse que celle déterminée ($1,12 \pm 0,18 \mu\text{mol/l}$) dans une récente étude de Preziosi *et al.* réalisée en France [11]. Selon nos critères de référence, des concentrations faibles pouvant indiquer un risque de déficit en sélénium ont été observées chez 1,6 % de nos sujets (valeur la plus basse : $0,53 \mu\text{mol/l}$). Selon les critères de l'étude française qui considèrent que des valeurs faibles en sélénium se situent en dessous de $0,75 \mu\text{mol/l}$ (contre $0,66 \mu\text{mol/l}$ dans notre étude), ce pourcentage de risque atteindrait alors 10,5 %. Toutes ces constatations peuvent reposer la question de l'importance de l'apport alimentaire actuel en sélénium en Belgique, d'autant que celui-ci joue un rôle fondamental dans le site actif de la GPx, enzyme détoxifiante des peroxydes lipidiques. Dans notre étude, nous n'avons pas pu établir de corrélation significative entre la concentration plasmatique en sélénium et l'activité de la GPx érythrocytaire, suggérant ainsi que les besoins de l'enzyme en cet oligo-élément ne sont pas totalement satisfaits. Au cours des années 1986-1987, Nève *et al.* [12] ont montré chez l'homme que la GPx n'atteignait son plateau d'activité maximale qu'après une prise orale de $110 \mu\text{g}$ de sélénium pendant 2 à 4 semaines. Toutes ces informations indiquent donc que la valeur des AJR (apports journaliers recommandés) en sélénium, qui a été fixée dans notre pays à $70 \mu\text{g/j}$, devrait être revue à la hausse afin que l'efficacité de cet oligo-élément soit optimale dans la défense de notre organisme contre les EOA délétères.

Pour les autres anti-oxydants, des comparaisons intéressantes peuvent être également établies avec l'étude de Preziosi *et al.* [11]. Nos valeurs moyennes pour les vitamines A, C et E ainsi que le rapport vitamine E/cholestérol sont très proches de celles obtenues dans cette étude française réalisée sur une population de 401 Français (âge 45-60 ans, 166 hommes et 235 femmes). En revanche, nous avons observé une concentration moyenne en SOD deux fois plus faible et une concentration en GPx légèrement plus élevée ($65,69 \pm 13,07 \text{ UI/g}$ d'hémoglobine *versus* $42,5 \pm 8,9 \text{ UI/g}$ d'hémoglobine). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences. Nous avons utilisé des kits de dosage commerciaux (Randox, Antrim, Grande-Bretagne) préconisant l'analyse sur le sang total tandis que Preziosi *et al.* [11] ont réalisé leur analyse à l'aide d'une technique de laboratoire sur des érythrocytes isolés. Pour la GPx, la méthodologie utilisée est similaire dans les deux cas (oxydation du glutathion par le tert-butyl hydroperoxyde) tandis que, pour la SOD, les substrats de réaction avec l'anion superoxyde ne sont pas identiques (chlorure de 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophényl)-5-phényltétrazolium pour le kit et pyrogallol dans l'étude de Preziosi *et al.* [11]).

Sur une autre population française de 1 039 sujets, Hercberg *et al.* [13] définissent des valeurs pour lesquelles il est permis de parler de risque de déficience en vitamines anti-oxydantes. Ces valeurs se situent en dessous de $0,35 \mu\text{mol/l}$ pour la vitamine A et de $10 \mu\text{mol/l}$ pour la vitamine E (ou $2 \mu\text{mol/mol}$ pour le rapport vitamine E/cholestérol). Selon ces critères et nos valeurs de référence, aucun de nos sujets ne présente de risque de déficience sévère en vitamines A et E, ce qui est en accord avec l'étude française. Pour la vitamine C, il est

généralement bien admis que des valeurs inférieures à 11,35 $\mu\text{mol/l}$ [13] correspondent à un risque élevé de déficience en cet anti-oxydant tandis que des valeurs comprises entre 11,35 $\mu\text{mol/l}$ et 19,89 mmol/l sont associées à un risque modéré de déficience [13, 14]. La mise en évidence de telles valeurs, qui se retrouvent respectivement chez 5,69 et 9,75 % de nos sujets, peut avoir son importance en matière de prévention. Récemment, les résultats de la Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, portant sur le suivi de 1 605 hommes pendant 4 ans, ont en effet montré que des concentrations plasmatiques de vitamine C inférieures à 11,4 $\mu\text{mol/l}$ étaient étroitement associées avec un risque accru d'infarctus aigu du myocarde [15], ce qui va dans le sens d'observations antérieures [16, 17]. Pour les autres anti-oxydants étudiés dans notre travail, les risques de déficience sont très faibles (PSH 2,4 %, SOD 2,43 % et GPx 1,62 %).

En accord avec Preziosi *et al.* [11], nous confirmons que les concentrations moyennes en anti-oxydants ne sont globalement pas différentes entre les hommes et les femmes, à l'exception de la vitamine C qui est significativement plus élevée chez les femmes. L'influence de certaines habitudes de vie (tabagisme) ou alimentaires se répercute de façon nette sur la concentration de certains anti-oxydants, et tout particulièrement de la vitamine C (*tableaux 2 et 3*). Dans notre étude, plus de 25 % des sujets sont sous l'influence du tabagisme qui est une source de stress oxydatif *via* la formation de radicaux libres dans la fumée de cigarette et le goudron [18, 19]. En accord avec plusieurs études chez l'homme [20, 21], nous confirmons que les concentrations sanguines en vitamine C, sélénium et les activités en GPx sont significativement diminuées de 31, 9 et 13 % chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Le questionnaire sur les habitudes alimentaires montre que plus de 25 % des sujets ne consomment jamais de fruit, ce qui se traduit par une diminution significative de 36,3 % de leur concentration sanguine en vitamine C, par comparaison aux personnes mangeant entre 1 et 4 fruits par jour (56,9 % de la population). Dans une moindre mesure, les concentrations en sélénium et en GPx sont également diminuées chez les non-consommateurs de fruits. Ces observations doivent nous interpeller dans la mesure où une étude randomisée vient récemment de montrer toute l'importance d'une alimentation riche en fruits dans la réduction du processus de l'athérosclérose [22].

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) est considérée comme un des facteurs prépondérants dans l'apparition de l'athérosclérose. De nombreux chercheurs ont pu mettre en évidence une relation étroite entre une concentration sanguine élevée en anticorps dirigés contre des LDL oxydées et la progression de l'athérosclérose carotidienne [23-25] ou le développement de problèmes coronariens dans la phase de post-transplantation cardiaque [26]. Dans notre étude, nous avons utilisé la seule méthode Elisa actuellement disponible sur le marché pour doser ces anticorps. Cette technique, initialement développée par Tatzber et Esterbauer [3], utilise des LDL oxydées par le Cu^{2+} comme antigènes qui fixent les anticorps contre les LDL oxydées présentes dans le plasma. La valeur moyenne \pm DS de 424,19 \pm 231,26 UI/l que nous avons

mesurée est en accord avec la littérature puisque, dans une étude autrichienne portant sur 800 Viennois (âge 20-60 ans), Tatzber *et al.* [27] ont montré que le pic de distribution de cet anticorps se situait à 300 UI/l et que deux tiers des sujets présentaient des valeurs comprises entre 150 et 600 UI/l. Un peu plus de 20 % de nos sujets présentent des concentrations en anticorps contre les LDL oxydées supérieures à 650 UI/l (valeur maximale 1 580 UI/l) mais cette observation n'est liée ni au facteur âge (*figure 3*), ni à des valeurs plus basses en anti-oxydants. De façon générale, les fumeurs ont des concentrations d'anticorps diminuées de 20 % par rapport aux non-fumeurs (*tableau 3*), sans que cette différence apparaisse toutefois significative. Cette observation est en contradiction avec l'étude de Fickl *et al.* [28] montrant que les fumeurs ont des concentrations en anticorps modérément augmentées par rapport aux non-fumeurs.

De nombreux patients atteints d'athérosclérose ne présentent aucun facteur de risque classique tels que l'hypertension artérielle, le tabagisme, les dyslipidémies ou le diabète sucré, ainsi que les antécédents familiaux. Récemment, l'hyperhomocystéinémie a été proposée comme un facteur de risque prédictif indépendant de ces risques classiques [29]. Une méta-analyse de 9 études a permis de montrer que le risque d'accidents cardiovasculaires est 1,8 fois supérieur chez le patient hyperhomocystéinémique par rapport à un individu avec une homocystéine normale [30]. L'homocystéine est un acide aminé intermédiaire du métabolisme de la méthionine dont l'action pro-athérogène serait liée à une production d'EOA conduisant à l'oxydation des LDL, à des actions directes sur l'endothélium ainsi qu'à des interactions avec les processus de coagulation et de fibrinolyse. Après optimisation des données, nous avons obtenu une concentration moyenne \pm DS en tHcy de $11,71 \pm 3,58 \mu\text{mol/l}$ alors que, dans la littérature, les valeurs de référence sont comprises entre 5 et $15 \mu\text{mol/l}$ [31]. La plupart de nos sujets sont dans cette fourchette de valeurs mais 19 % d'entre eux présentent néanmoins des concentrations comprises entre 15 et $30 \mu\text{mol/l}$, ce qui correspond à une hyperhomocystéinémie modérée. Seul un sujet dépassait le seuil de $30 \mu\text{mol/l}$ qui détermine une hyperhomocystéinémie moyenne. Aucune corrélation entre les concentrations de tHcy, et l'âge ainsi qu'avec tous les autres paramètres biologiques étudiés n'a pu être définie, indiquant bien que ce facteur prédictif de l'accident cardiovasculaire est indépendant des autres marqueurs de risque. Le tabagisme semble avoir une influence sur les concentrations de tHcy, mais celle-ci n'apparaît pas comme étant très significative. En revanche, la consommation de fruits se traduit par une diminution significative des concentrations sanguines en tHcy, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été décrit.

CONCLUSION

Malgré une littérature scientifique abondante, le monde médical est resté toutefois assez sceptique sur le concept et l'importance du stress oxydatif dans le développement de certaines maladies. Cette situation a comme principale origine que la détection *in vivo* des EOA était difficile à réaliser jusqu'à il y a peu. La durée de vie des EOA (surtout les radicaux libres) est en effet très courte de sorte qu'il n'est pratiquement pas possible de les déceler de manière directe. La plupart des

technologies mesurent donc des sous-produits de l'interaction des EOA avec leurs substrats biologiques, mais elles ont été pendant très longtemps uniquement utilisées avec beaucoup de variantes dans les laboratoires de recherche. Depuis quelques années, plusieurs firmes ont développé et commercialisé des systèmes d'analyse pouvant être appliqués en routine de sorte que l'évaluation de l'état de stress oxydatif (vitamines et enzymes anti-oxydantes, oligo-éléments, lipoprotéines oxydées) d'un individu est devenu maintenant à la portée du médecin généraliste. Dans un proche avenir, d'autres marqueurs de stress oxydatif (isoprostanes, ADN oxydé, protéines oxydées) seront également analysés en routine à l'aide de techniques immunologiques [32].

Même si la population choisie dans notre étude, en l'occurrence des donneurs de sang, peut être l'objet de critiques en termes de représentativité, nous pensons toutefois que nos résultats peuvent être utilisés à titre indicatif pour la Belgique où une telle analyse du statut de stress oxydatif n'a jamais été entreprise auparavant. Vu l'implication potentielle des taux sanguins faibles en anti-oxydants ou oligoéléments (ce qui se retrouve dans une population saine) dans l'apparition à long terme de certaines maladies cardiovasculaires [14, 33], il est important que le médecin généraliste - qui est le mieux placé pour connaître le patient dans ses habitudes de vie - puisse connaître le statut anti-oxydant de celui-ci. En termes de prévention, ce bilan devrait être complété par l'analyse du profil lipidique classique, auquel il conviendrait d'ajouter ces nouveaux marqueurs liés au stress oxydatif que sont les anticorps contre les LDL oxydées et l'homocystéine. Il est, par exemple, remarquable de constater que, parmi une population de donneurs de sang sélectionnés selon des critères de bonne santé, seuls 51,21 % des sujets présentent un bilan sanguin parfait pour l'association de quatre paramètres biochimiques (vitamine C, association cholestérol et LDL cholestérol, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine) considérés comme pouvant être des marqueurs prédictifs de risque d'accidents cardiovasculaires. En fonction du bilan global obtenu, une stratégie de prévention consistant à modifier les habitudes alimentaires, à prescrire des anti-oxydants ou, dans le cas d'une hyperhomocystéinémie, à donner le cas d'un supplément quotidien d'acide folique et de vitamine B12 pourra être proposée par le médecin généraliste à son patient.

Remerciements. Cette étude a été réalisée en partie grâce au support du Fonds national de la recherche scientifique. Les auteurs tiennent à remercier Madame Aldenhoff du Service de chimie médicale (CHU-Liège) pour sa contribution technique dans le dosage de l'homocystéine.

Article reçu le 14 août 1999, accepté le 1^{er} décembre 1999.

REFERENCES

1. Garewall HS. *Antioxidants and disease prevention*. Boca Raton, New York. Edition CRC Press, 1997.
2. Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. Espèces oxygénées activées en médecine humaine : une approche didactique. *Vaisseaux, Cœur, Poumon* 1998 ; 3 :133-8.

3. Tatzber F, Esterbauer H. Autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein. *In* : Rice-Evans C, Bellomo G. *Free radicals*. London, Richelieu Press, 1995 ; 9 : 245-62.
4. Lecerf JM. Vitamin E, antioxidants and atherosclerosis. *Rev Med Inter* 1994 ; 15 : 641-9.
5. Omaye ST, Turnbull JD, Sauerlich HE. Selected methods for the determination of ascorbic in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol* 1979 ; 62 : 3-11.
6. Allain CC, Poon LS, Chann CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974 ; 20 : 470-5.
7. Nève J, Chamart S, Molle L. Optimisation of a direct procedure of selenium in plasma and erythrocytes using Zeeman effect atomic absorption spectrometry. *In* : Bratter P, Schamer P. *Trace element analytical chemistry in medicine and biology*. Berlin, Walter de Gruyter, Berlin, 1987 : 1-10.
8. Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biophys* 1959 ; 82 : 70-7.
9. Jacob N, Guillaume L, Garçon L, Foglietti MJ. Dosage de l'homocystéine plasmatique totale et d'autres aminothiols par chromatographie liquide couplée à la détection par fluorescence. *Ann Biol Clin* 1997 ; 55 : 583-91.
10. Neve J, Vertongen F, Peretz A, Carpentier Y. A. Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge. *Ann Biol Clin* 1989 ; 47 : 138-43.
11. Preziosi P, Galan P, Herbeth B, *et al.* Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects. *J Am Coll Nutr* 1998 ; 3 : 244-9.
12. Neve J, Vertongen F, Capel P. Selenium supplementation in healthy Belgian adults : response in platelet glutathion peroxidase activity and other blood parameters. *Am J Clin Nutr* 1988 ; 48 : 139-43.
13. Hercberg S, Preziosi P, Galan P, *et al.* Vitamin status of a healthy French population : dietary intakes and biochemical markers. *Inter J Vit Nutr Res* 1994 ; 64 : 220-32.
14. Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 1991 ; 53 : S326-34.
15. Nyssönen K, Parviainen MT, Salonen R, Tuomilehto J, Salonen JT. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction : prospective population study of men from eastern Finland. *Br J Med* 1997 ; 314 : 634-8.
16. Gey KF, Stähelin HB, Eichholzer M. Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke : Basel Prospective Study. *Clin Invest* 1993 ; 71 : 3-6.
17. Gale CR, Martyn CN, Winter PD, Cooper C. Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart

disease in cohort of elderly people. *Br J Med* 1995 ; 310 : 1563-6.

18. Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. Fumée de cigarette : une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Médiasphère* 1998 ; 78 : 37-9.

19. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, *et al.* Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann NY Acad Sci USA* 1993 ; 686 : 72-90.

20. Liu CS, Chen HW, Lii CK, Chen SC, Wei YH. Alterations of small-molecular-weight antioxidants in the blood of smokers. *Chem Biol Interact* 1998 ; 116 : 143-54.

21. Tribble DL, Giuliano LJ, Fortmann SP. Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke. *Am J Clin Nutr* 1993 ; 58 : 886-90.

22. Miller E, Appel L, Risby T. Effects of dietary patterns on measures of lipid peroxidation : results from a randomized trial. *Circulation* 1998 ; 22 : 2390-5.

23. Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, *et al.* Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992 ; 339 : 883-7.

24. Maggi E, Finardi G, Poli M, *et al.* Specificity of autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coron Artery Dis* 1993 ; 4 : 1119-22.

25. Chiesa R, Melissano G, Castellano R, *et al.* L'augmentation des LDL oxydées constitue-t-elle un marqueur biologique de haut risque des plaques athérosclérotiques de la carotide ? *Ann Chir Vasc* 1998 ; 12 : 1-9.

26. Holvoet P, Vanbaecke J, Janssens S, Van de Werfet F, Collen D. Étude rétrospective et prospective de la relation entre l'oxydation des LDL et les maladies cardiovasculaires. *Vaisseaux, Cœur, Poumon* 1999 ; 4 : 66-70.

27. Tatzber F, Lapin A, Temmel C, Wonisch W. Antibodies against oxidized LDL (oLab) in Viennese working people. Oxidative stress workshop. Molecular mechanisms and pathophysiological consequences of oxidative damage in membranes and lipoproteins. European Region Austrian Biochemical Society. Seggau Castle, Styria, Austria 5-6 July 1996.

28. Fick H, Van Antwerpen VL, Richards GA, *et al.* Increased levels of autoantibodies to cardiolipin and oxidized low density lipoprotein are inversely associated with plasma vitamin C status in cigarette smokers. *Atherosclerosis* 1996 ; 124 : 75-81.

29. Clarke R, Daly L, Robinson K, *et al.* Hyperhomocysteinemia : an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991 ; 324 : 1149-55.

30. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 230-6.

31. Lutteri L, Chapelle JP, Gielen J.

Hyperhomocystéinémie et risque cardiovasculaire.
Vaisseaux, Cœur, Poumon 1999 ; 4 : 3-7.

32. Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO.
L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité
pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon* 1999 ; 4 :
148-54.

33. Nève J. Selenium as a risk factor for cardiovascular
diseases. *J Cardiovasc Risk* 1996 ; 3 : 42-47.