

Stress oxydant

# Comment évaluer le statut du patient?

J. Pincemail<sup>1</sup>, J. Haleng<sup>2</sup>, C. Le Goff<sup>2</sup>, C. Charlier<sup>3</sup>, JP Chapelle<sup>2</sup> et JO Defraigne<sup>1</sup>.  
Université de Liège – CHU Services de Chirurgie Cardiovasculaire<sup>1</sup>, de Chimie Médicale<sup>2</sup>  
et Toxicologie Clinique<sup>3</sup> Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.  
Contact : [J.Pincemail@chu.ulg.ac.be](mailto:J.Pincemail@chu.ulg.ac.be)

*Le stress oxydant, déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées activées et les défenses antioxydantes de l'organisme, peut contribuer à l'apparition de nombreuses pathologies liées au vieillissement.*

*Dans un souci de prévention, il s'avère donc nécessaire d'évaluer le niveau de "stress" de l'organisme, mais encore faut-il disposer d'outils performants et pertinents. Bilan de l'évaluation du stress oxydant : du traitement de l'échantillon sanguin à l'établissement des valeurs de référence en passant par le choix des analyses.*



**D**ans moins de deux ans, le monde scientifique fêtera le quarantième anniversaire de la découverte de la superoxyde dimutase (SOD) par les Américains J. Mc Cord et I. Fridovich. La purification de cette enzyme à partir de globules rouges fut la preuve irréfutable que l'oxygène, cette molécule indispensable

à la vie humaine, pouvait en même temps être un élément très toxique pour l'organisme. Cette hypothèse avait en fait déjà été avancée dans le milieu des années cinquante par R. Gerselman et en 1955 par D. Harman, le père de la "free radical theory". La découverte de la SOD fut le point de départ d'une impressionnante

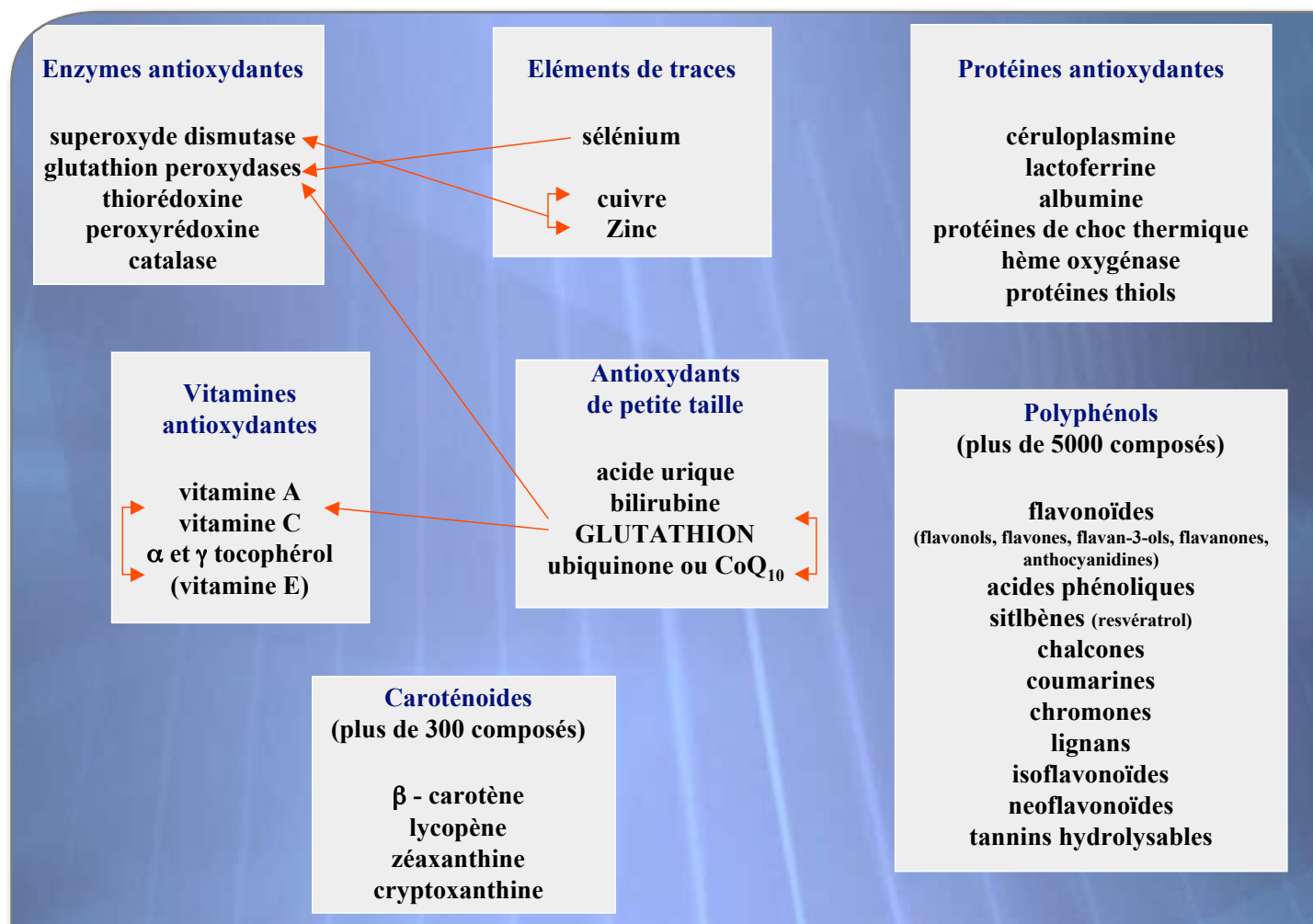
recherche scientifique à travers le monde entier pour aboutir aujourd'hui à plusieurs dizaines de milliers de publications par an sur la problématique dite du stress oxydant.

## À L'ORIGINE DE MULTIPLES PATHOLOGIES

Au fil des années, les cher-

cheurs du monde entier ont accumulé un nombre impressionnant de preuves montrant que l'oxygène pouvait produire des dérivés secondaires très instables (dont les fameux radicaux libres) capables de réagir avec les constituants essentiels de notre organisme à savoir les lipides, les protéines mais aussi

# Thématique



J. PINCEMAIL

Les vitamines C et E ainsi que l'ubiquinone (ou coenzyme Q<sub>10</sub>) agissent conjointement pour éliminer les lipides oxydés. Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant clé qui régénère tous ces antioxydants. En synergie avec le sélénium, il est également indispensable à l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), enzyme permettant de détruire ces mêmes lipides oxydés. Le cuivre et le zinc sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la superoxyde dismutase (SOD). Les fruits et légumes sont d'excellentes sources de vitamine C et de caroténoïdes ainsi que de la grande famille des polyphénols aux multiples activités biologiques. Exemple d'associations d'analyses dans le cadre de l'alimentation : vitamines C et E, cholestérol, β-carotène, sélénium, cuivre zinc et peroxydes lipidiques.

notre ADN. Actuellement, il est bien admis que l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) par les espèces oxydantes activées (EOA) représente un facteur de risque cardiovasculaire au même titre qu'un excès de cholestérol. Toutes ces modifications oxydatives jouent également un rôle très important dans la genèse des maladies neurodégénératives, des cancers, de la polyarthrite rhumatoïde mais aussi dans les complications associées au diabète et à l'excès de poids.

Pour se prémunir contre ces oxydations, notre organisme dispose d'un vaste et très compliqué réseau d'enzymes, de protéines et de molécules à caractère antioxydant qui ont cette particularité d'interagir entre elles (voir figure). De façon générale, le stress oxydant se définit comme étant un excès de production des dérivés toxiques de l'oxygène au détriment des défenses antioxydantes. Plusieurs situations sont à l'origine de cette surproduction : phénomènes inflammatoires

chroniques ou aigus, habitudes de vie non adéquates (tabagisme, consommation d'alcool), prise de la pilule contraceptive, exercice physique intense ou mal géré, exposition au soleil, à l'amiante ou à des radiations, interventions chirurgicales.

## SOURCES NATURELLES D'ANTIOXYDANTS

Actuellement, un intérêt grandissant est accordé à notre alimentation puisque c'est là que se trouve effectivement notre source principale d'antioxy-

dants. Les fruits et légumes sont ainsi devenus de véritables aliments santé en raison de leur contenu très important et surtout très diversifié en antioxydants (vitamines, caroténoïdes, polyphénols). Les résultats de toutes les études épidémiologiques indiquent en effet qu'une alimentation pauvre en fruits et légumes, qui se traduit par des taux sanguins faibles en vitamine C et en β-carotène, est associée avec un risque accru de développer des cancers et des maladies cardiovasculaires.

## Antioxydants et marqueurs d'oxydation

	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 µg/ml F: 6,21 à 15,18 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 µMol/litre 1,17 à 5,32 µMol/litre 156 à 705
	capacité antioxydante totale (Test ORAC)	test global de screening (ne peut être interprété seul) (plasma non déprotéinisé)	11 000 - 16 000 µM Equiv Trolox
	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 d'ischémie	H: < 70 mg/litre F: < 60 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 ng/ml B12: > 200 pg/ml
	superoxyde dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570 UI/g Hb
OLIGOÉLÉMENTS	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 UI/g Hb F: 26-58 UI/g Hb
	sélénium	co-facteur des différentes rôle dans l'immunité	GPx 94-130 µg/litre
	cuivre	co-facteur de la SOD - facteur prooxydant à forte concentration	H: 0,7-1,40 mg/litre 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
MARQUEURS D'OXYDATION	rapport Cu/Zn	marqueur de la présence d'un stress oxydant corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques	1 - 1,17
	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 µg/litre 0-20 µg/g créatinine
	protéasome	système de régulation des protéines oxydées sensible à la production des radicaux libres	
SOURCES D'OXYDATION	Advanced Glycated Endproducts (AGE) et récepteurs des AGE	marqueur de la glycolisation des protéines dans le diabète, l'athérosclérose, les maladies rénales et l'arthrite rhumatoïde	
	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 µMol/litre > 60 ans: 5-20 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



## DES MESURES DANS LES RÈGLES

Dès la découverte de la SOD, les biochimistes se sont intéressés à la mesure de marqueurs ou biomarqueurs permettant de déceler, dans des liquides biologiques (sang complet, plasma, sérum, urine), la présence d'un stress oxydant chez un individu. Cinq grandes catégories de mesures peuvent être recensées : analyse des antioxydants, détermination d'oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc), mesure des dommages oxydatifs (lipides, ADN, protéines), métabolisme du fer (catalyseur de la production d'EOA) et mise en évidence des sources de production d'EOA (hyperglycémie, phénomène inflammatoire, hyperhomocystéinémie). Toutes ces méthodes d'analyses présentent individuellement des lacunes au niveau de la sensibilité et de la spécificité. Il est donc réellement utopique de croire qu'un seul marqueur, du plus simple (malonaldéhyde) au plus compliqué (analyses génomiques ou protéomiques), soit capable à lui seul de mettre en évidence un phénomène aussi complexe que le stress oxydant.

Pendant très longtemps, ces analyses se sont faites dans des laboratoires de recherche. Depuis quelques années, certaines analyses (voir tableau) peuvent être réalisées en routine clinique à condition toutefois de respecter un pré-traitement analytique soigneux, ce qui est malheureusement loin d'être le cas au nom d'un pragmatisme certain. Deux règles d'or sont de mise en la matière : l'échantillon sanguin doit être immédiatement centrifugé après le prélèvement, tandis que les échantillons de



*Après la publication de plus de cent articles sur les radicaux libres et le stress oxydant, le Dr Joël Pincemail, chargé de recherche à l'Université de Liège en Belgique, s'engage dans la promotion de l'information et dans la formation des professionnels de santé et du grand public en matière d'antioxydants.*

plasma (ou d'urine) doivent être immédiatement congelés à une température inférieure ou égale à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ces précautions qui relèvent des bonnes pratiques de laboratoire sont notamment basées sur les trois considérations suivantes.

Dans le sang, les antioxydants agissent en synergie (système redox) et la concentration de l'un dépendra donc de celle de l'autre. Sachant que la vitamine C et le glutathion réduit (GSH), deux antioxydants majeurs de ce réseau complexe, sont bien connus pour leur caractère labile une fois le sang prélevé, il convient donc de « figer » au plus tôt ce réseau afin d'avoir le meilleur reflet possible de ce qui se passe in vivo.

Par ailleurs, il est connu depuis longtemps que beaucoup de marqueurs d'oxydation (notamment au niveau des lipides) se dégradent très vite en sous-produits dans le tube sanguin. Enfin, les globules blancs, qui

produisent naturellement et en permanence des EOA, peuvent être suractivés par certains coagulants comme l'héparine, ce qui représente donc une source ex vivo non désirable de production d'EOA dans le tube sanguin. Dans ce contexte, imaginons donc ce qui pourrait se passer au niveau des antioxydants chez un patient présentant un phénomène inflammatoire lié à une activation des globules blancs et dont le prélèvement sanguin ne soit pas traité de suite comme il se doit...

## VALEURS DE RÉFÉRENCE

C'est sur la base de cette approche analytique rigoureuse que peuvent être établies valablement des valeurs de référence pour chacun des paramètres liés à la mesure du stress oxydant comme ceux présentés dans le tableau I. Ces valeurs ont été déterminées à partir de sujets en bonne santé apparente n'ayant pas pris d'antioxydants sous forme de compléments depuis au moins quinze jours. Les conditions suivantes sont également requises pour éviter toute interférence notamment dans le dosage des antioxydants et des oligo-éléments. Les prises de sang doivent être réalisées de manière à éviter toute hémolyse. Celles-ci se font toujours entre huit et dix heures du matin car il faut tenir compte d'un cycle circadien qui modifie considérablement, à titre d'exemple, la concentration en glutathion réduit. Les sujets doivent se présenter à jeun depuis la veille au soir.

En effet, il faut un minimum de six à huit heures pour que s'atténue l'augmentation temporaire de la vitamine C liée

à l'absorption d'un simple jus d'orange. Les sujets doivent éviter toute activité sportive la veille du prélèvement puisque l'exercice physique induit un stress oxydant auquel l'organisme répond temporairement en sur-exprimant ses défenses antioxydantes. Idéalement, les sujets devraient aussi s'astreindre à ne pas fumer (une source importante de production d'EOA) dans les heures qui précèdent la prise de sang.

Dans le cadre du cycle menstruel chez la femme, il sera nécessaire de faire la prise de sang dans la phase folliculaire ou lutéale, car la production du  $17\beta$ -estradiol, maximale au moment du pic ovulatoire, est associée avec une augmentation de plus ou moins 20 % du sélénium et de la glutathion peroxydase.

En conclusion, il est maintenant possible d'établir en routine clinique une cartographie précise du statut de stress oxydant d'un individu à condition de respecter des conditions drastiques dans le prélèvement et le traitement de l'échantillon sanguin. Les outils de mesure présentés dans le tableau I sont susceptibles d'apporter aux différents professionnels de la santé des informations intéressantes concernant l'impact de notre alimentation sur notre santé.

Un questionnaire des habitudes alimentaires liées à la consommation de fruits et légumes, un maximum d'informations démographiques et cliniques sur le patient, une grande connaissance de la littérature liée à une expertise scientifique de haut niveau dans le domaine du stress oxydant seront nécessaires pour pouvoir réaliser une interprétation correcte des données. □