

Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine

Introduction

Dans des articles précédents (Medi-Sphere n°55 et 62, 1997), nous avons montré que l'oxygène, cet élément indispensable à la vie, pouvait dans certaines conditions devenir un danger mortel pour l'organisme via la formation d'espèces oxygénées activées (radicaux libres*, peroxyde d'hydrogène, oxygène singulet, acide hypochloreux) hautement réactionnelles. Une fois formées, les espèces oxygénées activées (EOA) peuvent en effet induire des cassures de l'ADN, inactiver des protéines ou induire des phénomènes de peroxydation lipidique (attaque d'acides gras polyinsaturés), ces derniers conduisant à une perte de la perméabilité membranaire des cellules.

Bien qu'elles puissent dans certains cas avoir un rôle physiologique (les globules blancs détruisent les bactéries via une production intracellulaire d'EOA), les EOA induisent toutefois des dégâts cellulaires irréversibles (stress oxydatif) lorsqu'elles sont produites en quantité excessive (c'est le cas de l'inflammation où les globules blancs activés par des endotoxines sécrètent dans le milieu extracellulaire des EOA qui s'attaqueront à des tissus sains).

Les EOA sont produites de façon permanente dans notre organisme. Par exemple, il a été calculé que l'ADN d'une seule cellule subit par jour plus de 10.000 attaques radicalaires. Afin de contrôler ou de limiter les effets délétères des EOA, notre organisme a développé une batterie de défenses antioxydantes qui lui ont d'ailleurs permis de s'adapter à vivre dans un environnement riche en oxygène.

* Pour rappel, un radical libre est une molécule caractérisée par la présence d'un électron libre (célibataire) dans sa structure électronique. Ce type de molécule est chimiquement très instable, ce qui lui confère une très grande réactivité vis-à-vis de toute une série de substrats biologiques. L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} (le point en indice indique la présence de l'électron libre) sont deux exemples de radicaux libres produits lors du métabolisme de l'oxygène.

1 Service de Chirurgie Cardiovasculaire, B35, ULg
2 CREDEC, Tour de Pathologie, ULg
3 Service de Transplantation, B35, ULg

Un système de défense antioxydante efficace

De façon générale, un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat, peut significativement retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser:

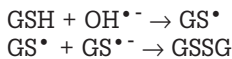
- en un **système de défense primaire** composé d'enzymes et de substances antioxydantes. Ces substances auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires. Elles se répartissent comme suit:
 - a) la superoxyde dismutase (SOD) qui diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Il en existe de trois types: une SOD contenant du cuivre et du zinc (CuZnSOD), localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes et dans les globules rouges; une SOD contenant du manganèse (Mn), située dans les mitochondries, et un facteur de haut poids moléculaire à activité SOD (EC-SOD) situé dans le plasma et les poumons humains.
 - b) la catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau. Elle est principalement présente dans les peroxysomes de diverses cellules, dans les plaquettes et le stroma des érythrocytes.
 - c) la glutathion peroxydase (GPx) qui détruit le peroxyde d'hydrogène mais aussi tous les peroxydes lipidiques ROOH (où R représente un acide gras polyinsaturé). Il s'agit d'un sélénoenzyme (Se-GPx) utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur et localisé dans le cytosol et les mitochondries des cellules.
 - d) il faut rappeler que le fer sous sa forme libre joue, en tant qu'élément catalyseur, un rôle prépondérant dans l'initiation et l'entretien des réactions radicalaires. La transferrine et la ferritine, protéines de stockage et de transport du fer, maintiennent ce métal dans un état inactif.
 - e) la destruction des EOA (et plus particulièrement des radicaux libres) est également assurée par des molécules antioxydantes ou piègeurs (*scavengers* en terminologie



Figure 1: Par interaction avec un radical lipidique R[•], la vitamine E (Vit E) se transforme en un radical tocophéryl (Vit E[•]). Ce dernier est régénéré en Vit E sous l'action de la vitamine C (Vit C) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Vit C[•]). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thylil (GS[•]) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG)



anglosaxonne) qui réagissent directement avec les radicaux libres pour former des dérivés oxydés. Ainsi, par exemple, le glutathion (GSH) réagira avec le radical OH[•] pour former du glutathion oxydé (GSSG) via la formation d'un radical thylil (GS[•]) intermédiaire selon le mécanisme suivant:



Citons également comme autres piègeurs l'acide urique, la bilirubine, le glucose, les protéines à groupement thiols (SH), la provitamine A (β-carotène) et les vitamines C (acide ascorbique), E (α-tocophérol) et Q (coenzyme Q-10 ou ubiquinone). Par son caractère hydrophobe, la vitamine E peut s'insérer au sein de la membrane biologique où elle agit en empêchant la propagation de chaînes radicalaires d'origine lipidique. Outre ses propriétés antioxydantes, la coenzyme Q-10, principalement concentrée dans les mitochondries, est un élément indispensable dans la chaîne de production d'énergie des cellules.

Il est remarquable de constater que ces substances antioxydantes peuvent agir en synergie dans leur lutte contre les radicaux libres ainsi que le montre la figure 1.

- en 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. Des phospholipases, des ADN endonucléases et ligase, des macroxyprotéinases font partie des enzymes principales de cette dernière ligne de défense contre les EOA.

Réaction de la cellule face à la production d'EOA

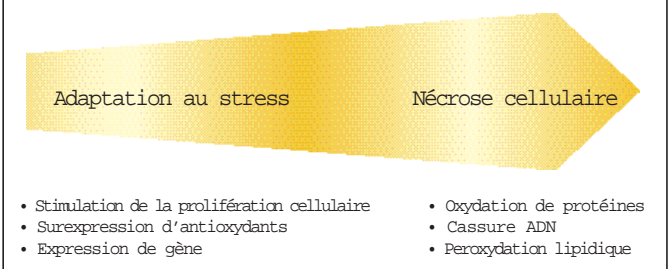
Produites en faible quantité, les EOA entraînent de la part de la cellule une réponse adaptative au stress qui se traduit par une augmentation de la croissance cellulaire, une surexpression des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase) et l'expression de gènes codant pour de nombreuses protéines.

Produites en quantité excessive, les EOA s'attaquent par contre à tous les substrats biologiques cités plus haut, détruisent les défenses antioxydantes et provoquent par leur action toxique des dégâts cellulaires souvent irréversibles entraînant des phénomènes de nécrose tissulaire (Figure 2).

Défenses antioxydantes et pathologies

Plus d'une centaine de pathologies sont associées avec une production excessive d'EOA qui engendrera des modifications importantes dans les défenses antioxydantes. Une évaluation de ces dernières pourra dès lors être utile au diagnostic (Tableau 1), à la recherche de thérapies adéquates et au suivi de l'évolution des maladies.

Figure 2: Intensité du stress oxydatif



Les antioxydants de type enzymatique se mesurent généralement dans les globules rouges tandis que les antioxydants piègeurs sont analysés dans le plasma des patients. Plusieurs firmes ont récemment développé des coffrets permettant une mesure rapide de la SOD et de la GPx dans les globules rouges. Il est à noter que la GPx étant une enzyme dépendante du sélénium, sa mesure donnera un reflet précis du taux de cet oligoélément. Dans le plasma, la vitamine C, l'acide urique, les protéines à groupement -SH, la bilirubine peuvent être dosés par un simple test colorimétrique tandis que le β-carotène, la vitamine E^{••} et l'ubiquinone nécessitent une technique plus sophistiquée de chromatographie liquide sur colonne. En complément de ces déterminations, il est également possible d'évaluer l'état antioxydant global d'un individu selon la méthode suivante (Figure 3).

La présence d'antioxydants dans le plasma permet à celui-ci d'inhiber des réactions radicalaires induites *in vitro* qui, par attaque de différentes cibles, donnent des produits d'oxydation facilement mesurables par des techniques spectrophotométriques. Toute diminution de ce pouvoir inhibiteur indique donc que les antioxydants endogènes ont été consommés suite à leur interaction avec les EOA produites *in vivo*.

* Afin d'évaluer correctement la concentration de vitamine E, il est nécessaire d'exprimer celle-ci par rapport à la concentration en lipides totaux ou en cholestérol



Tableau 1: Exemples de quelques pathologies humaines associées avec des modifications de la concentration en antioxydants

| Evolution de l'antioxydant | Situations pathologiques |
|---|--|
| Diminution de la vitamine C | Maladies respiratoires (emphysème, bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), fumeur) Pancréatite aiguë Hémochromatose |
| Diminution de la vitamine E | Syndrome de détresse respiratoire Transplantation d'organes Pontage coronarien Choc septique Traumatisme crânien Hémochromatose |
| Diminution du glutathion, protéines-SH | Syndrome immunodéficient acquis Syndrome de détresse respiratoire |
| Diminution de l'ubiquinone | Hyperlipidémie |
| Augmentation de l'acide urique | Phénomènes d'ischémie - reperfusion |
| Diminution pouvoir antioxydant total | Maladies respiratoires (asthme, BPCO, fumeur) Maladies du foie Naissance de prématurés |
| Diminution de la GPX, carence en sélénium | Cancer Alcoolisme Mucoviscidose Maladie de Keshan Maladies cardiovasculaires Stérilité Maladie de Crohn Arthrite rhumatoïde Cataracte (cristallin) |
| Augmentation de la SOD | Leucémie Hépatite Diabète Dystrophie musculaire de Duchenne Syndrome de détresse respiratoire Syndrome de Down |
| Diminution de la SOD | Arthrite rhumatoïde Anémie de Fanconi Hypocuprose Syndromes immunologiquement déficients |

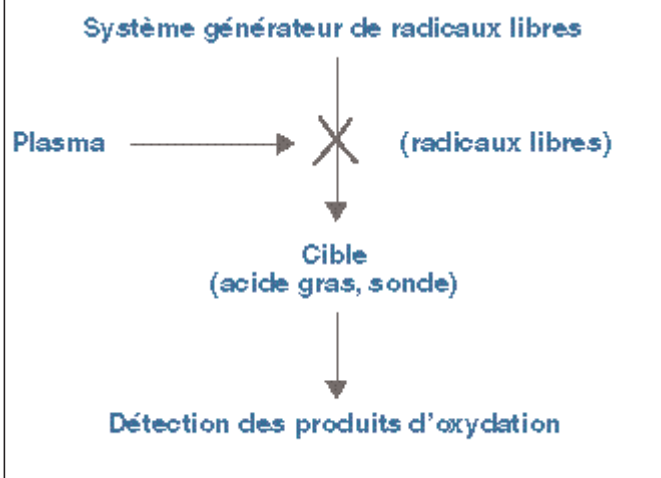
Thérapie antioxydante en clinique humaine

Dans le n° 55 de Medi-Sphere, nous avons passé en revue les différents antioxydants qui peuvent être utilisés en clinique dans le cas de pathologies où les défenses naturelles sont largement détruites. Pour rappel, ces antioxydants peuvent appartenir à quatre catégories: molécules interagissant de manière directe avec les EOA (enzymes antioxydantes, β-carotène, vitamines C et E, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion, probucol, acide lipoïque, etc), molécules ou cofacteur renforçant la défense antioxydante (N-acétylcystéine, sélénium, cuivre), molécules maintenant le fer dans un état inactif (Desféral®, hydroxypyridines), molécules inhibitrices d'enzymes responsables de la formation d'EOA (allopurinol).

A titre d'illustration, voici quelques exemples tirés de la littérature. L'administration journalière de 40mg/kg de Desféral® retarde significativement la progression de l'infection HIV vers l'apparition du syndrome clinique d'immunodéficience acquise (SIDA). Un usage continu de 600mg de N-acétylcystéine par jour permet d'apporter une meilleure qualité de vie aux patients souffrant de bronchopneumopathies chroniques destructives (BPCD). Chez les transplantés rénaux, une injection d'un cocktail de vitamines (500mg Vit C, 1mg de Vit E, 5mg d'acétate de tocophérol et 5,5mg de palmitate de rétinol) juste avant la reperfusion de l'organe améliore significativement les fonctions immédiates du rein. Lors d'un infarctus du myocarde, l'administration de 300mg d'allopurinol diminue les dommages cellulaires consécutifs à la reperfusion du cœur.



Figure 3:



Antioxydants et alimentation

Il est impossible d'arrêter la formation d'EOA car il s'agit d'un processus normal de notre organisme. De plus, notre monde industrialisé nous impose un système de vie (exposition prolongée au soleil, pollution atmosphérique, ozone, stress au travail, radiations, pesticides, tabac, alcool, absorption de nombreux types de médicaments) qui provoque dans notre organisme des réactions chimiques de type radicalaire dans des proportions non prévues par la nature. Par exemple, il apparaît chez les fumeurs que les taux d'antioxydants (vitamines C et E, sélénium) sont nettement plus faibles que ceux d'un non-fumeur suite au fait qu'une bouffée de cigarette produit de l'ordre de 10^{19} radicaux libres.

Une alimentation saine et variée (légumes, poissons, huile de soja, fruits) qui devrait nous apporter les antioxydants nécessaires n'est donc plus suffisante pour juguler les effets néfastes des EOA. Cette situation est d'autant plus alarmante que des modifications des sols de culture ainsi que des habitudes alimentaires de plus en plus mauvaises ont eu comme conséquence néfaste que l'alimentation habituelle en Europe du Nord contient de moins en moins de vitamines et d'oligoéléments. Ainsi, par exemple, en Angleterre, la consommation moyenne de sélénium, cofacteur de la glutathion peroxydase, est passée par habitant de $60\mu\text{g}$ par jour à $30\mu\text{g}$ en moins de 25 ans alors que la consommation recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé est de 50 à $200\mu\text{g}$ par jour. Dès 1985, une étude finlandaise portant sur 12.000 personnes a montré un risque de cancer accru parmi les personnes présentant une déficience en vitamine E et en sélénium par rapport à des individus ayant des taux de ces antioxydants situés dans des valeurs normales.

A la lueur de ces informations, il n'est donc pas interdit de penser qu'une absorption d'antioxydants indépendante de l'alimentation puisse se révéler bénéfique pour notre organisme. Actuellement, l'étude française SUVIMAX (SUplémentation en Vitamines et Minéraux AntioXYdants) qui porte sur 15.000 personnes essaie de démontrer l'hypothèse de recherche selon laquelle l'ingestion journalière de β -carotène (6mg), de vitamines C (120mg) et E (15mg), de zinc (20mg) et de sélénium ($100\mu\text{g}$) à faibles doses (correspondant en fait aux besoins journaliers) pourrait prévenir l'apparition

de certaines maladies cardiaques et du cancer. Les résultats définitifs de cette étude suivie médicalement ne seront toutefois pas connus avant l'an 2002.

Il faut toutefois garder à l'esprit que l'utilisation massive d'antioxydants peut entraîner des effets néfastes. Quel que soit l'antioxydant utilisé, il peut à fortes concentrations (notamment par interaction avec le fer) devenir un agent pro-oxydant capable d'initier, comme c'est le cas avec la vitamine C, des phénomènes de peroxydation lipidique. Les sels minéraux (sélénium, zinc) à fortes doses présentent aussi des problèmes de toxicité. La prudence reste donc de mise afin d'éviter l'utilisation particulièrement édifiante de vitamines telle qu'elle se pratique aux Etats-Unis. Conscients de la pauvreté de leur alimentation, les Américains n'hésitent pas à absorber jusqu'à plus de 60 complexes vitaminés par jour. Il s'agit là d'un phénomène proche de la toxicomanie qui peut s'avérer extrêmement préjudiciable pour l'organisme ainsi que le souligne le Professeur Herczberg, responsable de l'étude SUVIMAX.

Conclusions

Evaluer le statut antioxydant du patient devrait aider le médecin à obtenir un meilleur diagnostic dans certaines maladies (Tableau 1) et à corriger d'éventuelles déficiences en tel ou tel antioxydant. D'autre part, le médecin peut être amené dans certains cas à préconiser à titre préventif la prise d'antioxydants. Par exemple, certains de ses patients pourront subir des interventions chirurgicales importantes qui endommagent très fortement les défenses antioxydantes suite à la formation massive d'EOA. Dans le cadre de pontages coronariens avec mise sous circulation extracorporelle ou de transplantations d'organes, nous avons pu montrer que le taux sanguin de vitamine E, un antioxydant primordial dans la lutte contre les EOA, était diminué de moitié dans les jours qui suivaient l'intervention chirurgicale. Ceci peut justifier l'utilisation d'un traitement antioxydant approprié dans les quinze jours qui précèdent l'opération. □

Références

1. JA Gimpel, JR Lahrer, AJ van der Molen. Reduction of reperfusion injury of human myocardium by allopurinol: a clinical study. *Free Rad Biol Med* 1995; 19: 251-5.
2. R Gonzales. Superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1984; 44: 4137-9.
3. B Matkovic et al. A comparative study of superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in red blood cells from muscular dystrophy patients and normal controls. *Clin Chem Acta* 1982; 118: 289-92.
4. J Pincemail, ML Faymonville, A Thirion et al. Neutrophils activation evidenced by plasmatic myeloperoxidase release during cardiopulmonary bypass. Consequence on vitamin E status. *Ann NY Acad Sci* 1989; 570: 501-2.
5. J Pincemail, JO Defraigne, C Franssen et al. Evidence for free radical formation during human kidney transplantation. *Free Rad Biol Med* 1995; 15: 343-8.
6. J Pincemail, JO Defraigne and R Limet. Oxidative stress in clinical situations - fact or fancy. *Europ J Anaesthesiol* 1996; 13: 219-34.
7. H Rabl, G Khoschsorur, T Colombo et al. A multivitamin infusion prevents lipid peroxidation and improves transplantation outcome. *Kidney Inter* 1993; 43: 912-7.
8. I Rahman. Decreased plasma antioxidant capacity in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 1994.
9. T Rammen. Selenium status in patients with Crown's disease. *Am J Clin Nut* 1992; 56: 933-7.
10. Salonen, G Alfthan, P Puska et al. Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium, vitamins A and E: matched case-control analysis of prospective data. *Br Med J* 1985; 290: 417-20.
11. U Tarp et al. Low selenium level in severe rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1985; 14: 97-101.