

STRESS OXYDANT ET ANTIOXYDANTS : mythes et réalités

J.O. DEFRAIGNE (1), J. PINCEMAIL (2)

RÉSUMÉ : 1969 – 2009 : 40 ans de recherches intenses sur les rôles du stress oxydant et des antioxydants dans l'organisme humain se sont écoulés depuis la très importante publication de McCord et Fridovich en 1969 démontrant pour la première fois l'existence de la superoxyde dismutase (SOD), enzyme capable d'éliminer l'anion superoxyde qui résulte de la réduction univalente de l'oxygène. Actuellement, il est bien admis que le stress oxydant – un déséquilibre résultant d'une production accrue des espèces oxygénées de l'oxygène (EOA) et d'une altération à la baisse des défenses antioxydantes – intervient dans le décours de diverses pathologies (maladies cardiovasculaires, cancer, diabète sucré,...). Toutefois, il a été démontré que, de façon paradoxale, les EOA jouent un rôle physiologique très important en favorisant des mécanismes naturels de défense (e.g. l'apoptose). Ceci peut expliquer en partie pourquoi les nombreuses études d'intervention menées avec des antioxydants pris de façon chronique sont loin d'avoir montré les résultats spectaculaires attendus dans la prévention ou les complications associées à ces pathologies. L'étude SUVIMAX récemment menée en France sur près de 15.000 sujets sains en est une excellente illustration : effet très protecteur des antioxydants à des doses nutritionnelles chez les hommes (bas statut en antioxydants) contre le cancer de la prostate, aucun effet cardio-protecteur voire même une hausse des cancers de la peau chez les femmes (statut antioxydant peu altéré). Depuis peu, une attention toute particulière est apportée quant aux effets protecteurs sur la santé d'une alimentation riche en fruits et légumes (5 portions par jour) naturellement riches en antioxydants de toutes sortes (vitamine C, caroténoïdes, polyphénols).

MOTS-CLÉS : Radicaux libres - Formes activées de l'oxygène - Antioxydants - Diabète - Affection cardiovasculaire

INTRODUCTION

Radicaux libres, espèces oxygénées activées (EOA), stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations relatives aux antioxydants, sans parfois l'esprit critique nécessaire.

Actuellement, dans ce sujet médiatisé à outrance, un écart manifeste existe entre les messages délivrés par les scientifiques spécialistes du domaine et la sensibilité ou la perception qu'en ont les médecins spécialistes ou généralistes. Face aux liens évoqués entre les radicaux libres et l'apparition de certaines pathologies,

OXYDATION STRESS AND ANTIOXYDANTS : LEGEND AND REALITIES

SUMMARY : 1969 - 2009 : 40 years of intensive research about the role of oxidative stress and antioxidants in the human organism since the very important publication by McCord and Fridovich in 1969 demonstrating for the first time the existence of the superoxide dismutase (SOD), enzyme able of eliminating the superoxide anion resulting from the univalent reduction of oxygen. It is currently admitted that oxidative stress – an imbalance due to an increased production of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in antioxidant defences – intervenes in the course of several pathologies including cardiovascular diseases, cancer and diabetes. However, recent studies have also evidenced the physiological role of ROS as promoters of natural defences (e.g. apoptosis). This may partially explain why many intervention studies with chronic antioxidants have not shown expected positive effects in the prevention of diseases or their complications. The SUVIMAX study recently performed in France on 15.000 healthily persons highlights this view point : significant protective effect in prostate cancer in males (poor natural antioxidant status); no cardiovascular effect in females with even an increased incidence of skin cancer in females (natural good antioxidant status). Since a few years, attention has been part to the protective effect on health of a diet enriched in fruits and vegetables (5 servings a day) which contain high levels of several antioxidants (vitamin C, carotenoids, polyphenols).

KEYWORDS : Free radicals - Activated oxygen species - Antioxidants - Diabetes - Cardiovascular disease

certain réagissent négativement et affirment que rien n'est prouvé dans ce domaine - alors que, pour la seule année 2003, plus de 45000 publications ont été consacrées aux antioxydants; d'autres s'enthousiasment (souvent avec excès) sur les vertus bénéfiques des antioxydants. Dans les deux cas de figure, il apparaît clairement que l'information en provenance des milieux scientifiques n'est pas toujours correctement transmise et comprise.

PETITE HISTOIRE DES RADICAUX LIBRES

Au milieu des années 50, parmi les premiers, Gerschman et al. montrent que l'oxygène, molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme (1). Inspiré par ces travaux, Harman propose la «free radical theory of ageing» (2) : via la production de radicaux libres (entités chimiques très instables et réactionnelles suite à la présence d'un électron libre dans leur structure), l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les Américains McCord et Fridovich (3) isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant : la super-

1) Professeur, 2) Attaché scientifique, Service de Chirurgie Cardiovasculaire et Laboratoire de Chirurgie expérimentale (CREDEC), CHU de Liège.

oxyde dismutase (SOD) qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. Ceci est alors le point de départ d'un nombre faramineux de recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique. Toutefois, pendant très longtemps, des doutes sont émis quant à l'existence réelle des radicaux libres et sur leurs effets *in vivo*. Tout au début des années 1990, cette incertitude est levée de façon irréfutable grâce à l'utilisation de la technique de la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au spin trapping («piégeur de spin») dans des modèles de stress oxydant *in vivo*. A titre d'exemple, la formation de radicaux libres a été mise en évidence dans le plasma de rats exposés au tétrachlorure de carbone (4) ou de chiens et de lapins dont le cœur (5) ou les reins (6) étaient soumis à des phénomènes d'ischémie – reperfusion. Chez l'homme, démonstration a été faite chez des patients soumis à une angioplastie coronarienne (7) ou à une chirurgie cardiovasculaire sous circulation extracorporelle (8).

Dans la foulée de la découverte de la SOD, les scientifiques élaborent également de multiples expériences *in vitro* qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dégâts cellulaires importants via le déclenchement de cassures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de peroxydation lipidique.

Parallèlement, une des étapes est le développement de marqueurs biologiques pour l'évaluation des dégâts cellulaires engendrés par les EOA. Au milieu des années 70, le test TBARS («thiobarbituric reactive substances») a été développé pour la détection du processus de peroxydation lipidique consécutive à l'interaction des EOA avec les lipides. De nature simpliste, cette méthode mesure par voie colorimétrique le produit de la réaction de l'acide thiobarbiturique avec la malonaldéhyde (MDA), un sous-produit des lipides oxydés. Toutefois, les très nombreux artéfacts liés à la technique la rendent peu fiable. Ce n'est que vers la fin des années 80 qu'apparaissent d'autres méthodes plus appropriées pour l'évaluation des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN ou des protéines chez des sujets sains ou des patients (9). Grâce à l'ensemble de ces méthodes, l'efficacité de molécules à caractère antioxydant scientifiques peut alors être testée *in vivo* dans divers modèles de stress oxydant animaux et humains. Le

développement de nouvelles méthodes (e.g. le dosage des isoprostanes comme marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides) reste cependant un sujet de préoccupation permanente pour les scientifiques impliqués dans le domaine du stress oxydant.

LE VASTE MONDE DES ANTIOXYDANTS

Dès le début du XX^{ème} siècle, l'industrie s'est intéressée de près aux antioxydants (ou «antioxygène»), molécules capables par exemple de réduire les effets de l'oxygène sur la corrosion des métaux. En biologie, les toutes premières recherches sur les antioxydants ont montré leur capacité à réduire l'oxydation des acides gras insaturés et, donc, leur rancissement. Cependant, c'est plus tard avec l'identification durant l'entre-deux-guerres des vitamines C (Szent – Gyorgyi, 1928) et E (Evans et Bishop, 1922) qu'est apparue l'importance des antioxydants en biochimie.

Comme le montre la figure 1, l'organisme dispose d'un vaste réseau d'antioxydants ou de défense qui ne se limite pas qu'aux seules vitamines C et E. D'une part, une multitude d'antioxydants proprement dits sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par notre alimentation. D'autre part, des systèmes enzymatiques extrêmement complexes assurent la réparation des éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN. S'y ajoutent quelques oligoéléments (sélénium, cuivre et zinc) qui sont les cofacteurs de divers enzymes à activité antioxydante. Il est impossible ici de faire une revue exhaustive de tous les mécanismes d'action de ces antioxydants. Soulignons néanmoins un point capital. Les antioxydants de faible poids moléculaire ont un mode ou une synergie d'action complexes. En effet, des antioxydants comme la vitamine C ou E se transforment eux-mêmes en radicaux libres lors de la neutralisation de certains dérivés toxiques de l'oxygène. Ainsi, la vitamine E seule peut, dans certaines conditions, induire la peroxydation d'acides gras ou de lipoprotéines alors que, normalement, elle prévient l'oxydation de ces mêmes lipides (10); ce phénomène apparemment paradoxal est lié à la formation du radical tocophéryl. Des observations similaires ont été faites avec l'ubiquinone (CoQ10) et la vitamine C et avec la SOD bien que, dans ce dernier cas, le mécanisme d'action oxydante soit différent. Le glutathion (GSH) joue un rôle unique et essentiel dans la préservation des formes actives de divers antioxydants de faible taille (vitamines C, E, ubiquinone, polyphénols). A ce

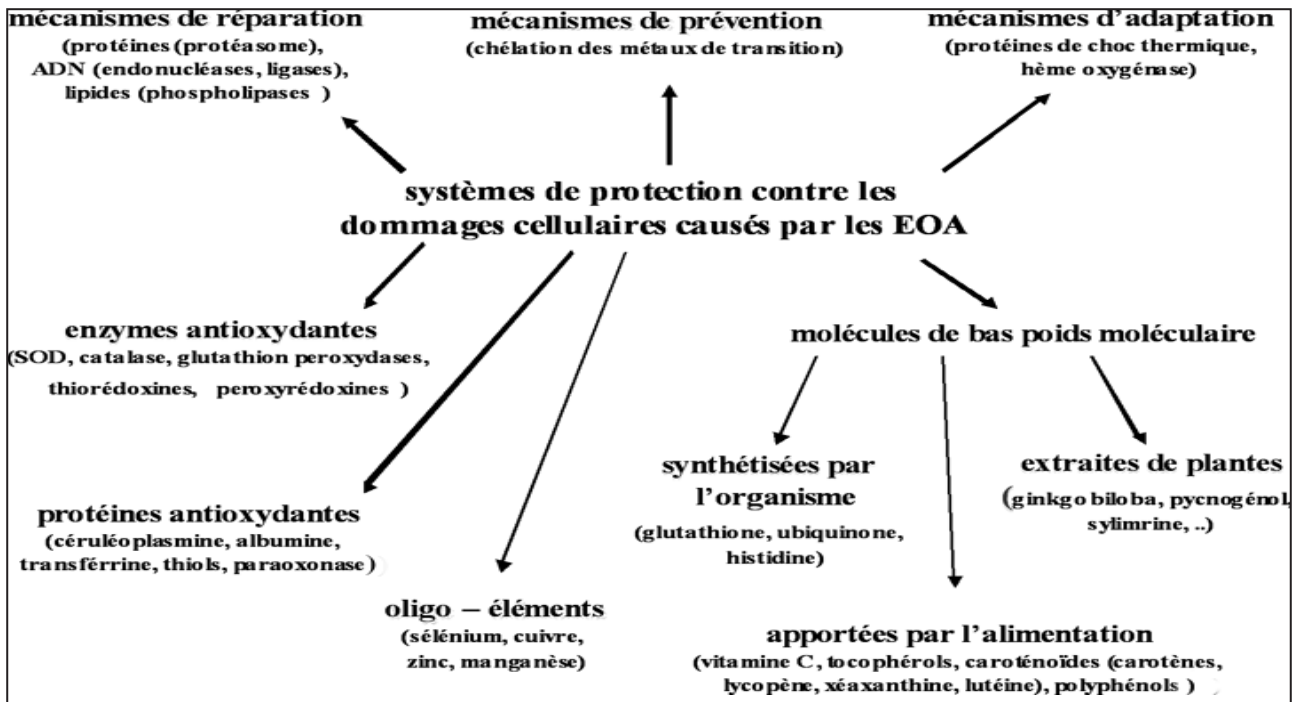


Figure 1. Réseau des antioxydants (53).

titre, le GSH constitue l'antioxydant principal de l'organisme d'autant qu'il est aussi le co-facteur de toute une série d'enzymes antioxydantes (glutathion peroxydases, glutathion réductase, thiorédoxines et peroxyrédoxines).

La synergie d'action implique l'existence de rapports de concentrations plasmatiques ou tissulaires bien définis entre les divers antioxydants. Dans l'étude réalisée à l'initiative de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur une cohorte de sujets issus de 12 populations européennes (WHO/Monica study), la valeur du rapport de concentrations molaires entre les vitamines C et E est un facteur prédictif de l'apparition de pathologies cardiovasculaires (11). Une valeur idéale de ce rapport (entre 1,3 et 1,5) s'observe dans divers pays du Sud de l'Europe (Italie, France, Espagne) où la mortalité par accident cardiovasculaire est plus faible que dans les pays du Nord de l'Europe (Ecosse, Irlande, Allemagne) où la valeur du rapport n'atteint que 0,6 à 0,8. La consommation d'aliments riches en vitamines C et E est plus importante dans les pays méditerranéens que dans le nord de l'Europe, et les habitudes alimentaires sont sans doute le principal facteur qui détermine ce rapport.

Récemment, on a montré que les EOA sont de façon générale capables d'activer l'expression de gènes codant notamment pour des cytokines proinflammatoires ou des protéines d'adhésion. Il ne faut ainsi pas négliger le fait que les

antioxydants ont aussi une action sur la régulation de divers gènes et dont nous sommes loin de connaître tous les mécanismes d'action (12).

STRESS OXYDANTS PATHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'EOA, soit à une diminution de la capacité de défense antioxydante (13). La pollution, le tabagisme, une consommation excessive d'alcool, la prise de pilule contraceptive, l'exposition immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante, la pratique du sport de haut niveau et l'inflammation chronique sont, par exemple, autant de sources de production d'EOA. Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols) favorise une baisse de la capacité antioxydante. Si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de pathologies diverses. Un stress oxydant «pathologique» est ainsi potentiellement impliqué dans de nombreuses affections (plus de 200 ont été recensées) ou dans le développement de complications associées à celles-ci (e.g. diabète). A titre d'exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires tandis

que celle de l'ADN se retrouve dans diverses étapes qui conduisent au développement de cancers.

Au cours du temps, la notion de stress oxydant a évolué notamment avec l'avènement de la biologie moléculaire qui a montré que les EOA ont aussi un rôle physiologique important (14). En effet, les EOA produites en permanence dans l'organisme sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (prolifération cellulaire normale, métabolisme normal, état redox normal pour l'expression de gènes). Dans cette perspective, les antioxydants sont alors des régulateurs de la production des EOA, dont ils préviennent les effets délétères potentiels. La vraisemblable nécessité d'un stress oxydant «physiologique» régulateur explique sans doute en partie les échecs relatifs d'études interventionnelles basées sur des suppléments en antioxydants.

UN PARADIGME : LE DIABÈTE SUCRÉ ET LE RÔLE INCONTOURNABLE DU STRESS OXYDANT

Nous n'insisterons pas sur l'épidémiologie et les données cliniques du diabète de type 2. Simplement, des complications importantes (rétinopathie, néphropathie, athérosclérose, maladies cardiovasculaires, ...) assombrissent l'évolution de la maladie. Des études récentes font du stress oxydant un élément de liaison entre insulino-résistance, hypertension, syndrome métabolique, et complications cardiovasculaires associées au diabète. On peut tenter d'établir un schéma général des mécanismes impliqués (15). Au niveau cellulaire, le glucose et les acides gras libres en excès induisent une production mitochondriale accrue d'EOA (plus particulièrement d'anion superoxyde). Outre des lésions mitochondriales et une altération de la chaîne de transport d'électrons, les EOA activent simultanément la phosphocréatine kinase (PKC) et le facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa-B). La production d'anion superoxyde et de monoxyde d'azote (NO) est accrue et ils réagissent entre eux pour former des peroxynitrites. Par leur caractère particulièrement oxydant, ces derniers altèrent l'ADN, processus important dans l'activation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP). Une fois activée, cette enzyme contribue à diminuer l'activité de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), essentielle dans la glycolyse, notamment au niveau musculaire.

In fine, au niveau du muscle et des adipocytes, la fonction des transporteurs membranaires du glucose (GLUT 4) dont l'expression est insulino-dépendante s'altère. La réduction de leur

expression membranaire contribue aussi à la résistance à l'insuline et à l'hyperglycémie.

L'atteinte des mitochondries (et en particulier de l'ADN mitochondrial) apparaît comme un élément-clé de ce schéma mécanistique. L'analyse de biopsies musculaires et la résonance magnétique nucléaire ont montré une réduction de la masse des mitochondries chez des diabétiques de type 2; la fonctionnalité des mitochondries est également diminuée, ce qui expliquerait la production excessive d'EOA (16). D'autres travaux ont également montré que le dysfonctionnement mitochondrial s'associe à des changements d'expression et de fonction d'une protéine découplante (qui diminue la production d'ATP) de la membrane interne de la mitochondrie, l'UCP-2 (UnCoupling Protein-2). En condition d'hyperglycémie (glucotoxicité), UCP-2 est surexprimée, ce qui diminue à la longue l'insulinosécrétion induite par le glucose dans les cellules B du pancréas (17). Plusieurs travaux indiquent par ailleurs que l'activité de l'UCP-2 est stimulée par les EOA.

Le glucose, facilement oxydable en présence de fer, est aussi une importante source de stress oxydant. Cette oxydation forme des EOA et produit la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML), groupement qui capte facilement le cuivre, ce qui déclenche des réactions qui produisent des radicaux libres (réaction de Fenton) : il en résulte une augmentation accrue de la peroxydation lipidique (18). Par ailleurs, le glucose réagit facilement avec les groupements 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). Ces AGE ont un rôle essentiel dans le développement des complications du diabète (19). En effet, les AGE plasmatiques se lient à des récepteurs (RAGE) présents sur les cellules endothéliales, sur les cellules glomérulaires et sur les macrophages. L'activation de ces récepteurs enclenche une production d'EOA et active le facteur de transcription NFκB. Parmi les AGE, figure la pentosidine qui résulte de la réaction de pentoses avec les protéines. Sa concentration s'élève avec l'âge, dans le diabète et dans les maladies rénales au stade terminal.

LA DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE

Les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins régulent le tonus vasculaire (21) notamment en libérant du monoxyde d'azote

(NO), qui induit la relaxation des cellules musculaires lisses de la média. Le NO s'oppose aussi aux effets vasoconstricteurs d'agents potentiellement libérés par les cellules endothéliales sous l'action de divers stimuli (cytokines, radicaux libres, lipides oxydés). En situation physiologique, on observe une production basale de NO.

De nombreux facteurs peuvent être à l'origine d'un dysfonctionnement endothélial: âge, tabac, hypertension, hypercholestérolémie, hyperhomocystéinémie, mais aussi hyperglycémie du diabète de type 2. Dans ce cas, l'endothélium altéré libère des EOA et du NO et ceci en quantité anormalement élevée. Le NO perd alors ses propriétés physiologiques et devient au contraire très toxique par sa réaction instantanée avec les EOA et la formation de peroxy-nitrites. L'apparition d'une vasoconstriction est ainsi favorisée.

Un dysfonctionnement endothélial est aussi la première étape du processus d'athérosclérose (22). Dans ce cas, les lipoprotéines de faible densité («low density lipoproteins» ou LDL) et les monocytes sanguins, qui se différencient ensuite en macrophages, s'accumulent dans la paroi. Les EOA produits par l'endothélium lésé conduisent à l'oxydation des LDL (tant dans leur partie protéique que dans leur partie lipidique). Les LDL oxydées sont alors reconnues par des récepteurs nonrégulés situés à la surface des macrophages qui se transforment en cellules spumeuses observables dans la plaque d'athérome. En outre, le dysfonctionnement endothélial entretient un environnement inflammatoire, responsable d'une production accrue d'EOA. Toutes ces observations montrent l'implication d'un stress oxydant au cours des processus qui associent le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et les atteintes cardiovasculaires (23, 24). Des techniques d'évaluation *in vivo* de la fonction endothéliale sont actuellement possibles comme par exemple la mesure de la vasodilatation dépendante du flux sanguin (Flow Mediated Dilatation ou FMD) au niveau de l'artère brachiale, le laser Doppler au niveau de la peau et le PET scan au niveau du cœur. Plusieurs travaux ont également montré chez plus de 2.000 patients atteints d'athérosclérose que le dysfonctionnement endothélial identifie plus précisément les sujets dont le risque cardiovasculaire est augmenté à court ou à long terme (25, 26).

LES ÉTUDES D'INTERVENTION AVEC LES COMPLÉMENTS EN ANTIOXYDANTS

En 1992, un recensement de 128 enquêtes alimentaires sur 156 montrait qu'une consommation régulière en fruits et légumes riches en antioxy-

dants protège vis-à-vis des cancers de tous types mais avec des effets variables d'un type à l'autre (27). Ceci fut confirmé par une autre méta-analyse en 2005 mais seulement pour le cancer du sein et de l'estomac (28). Entre 1996 et 2005, au moins une dizaine d'études portant sur plusieurs milliers de sujets ont mis en évidence l'impact positif des fruits et légumes dans la réduction de l'incidence des maladies cardiovasculaires (29). Par ailleurs, l'étude de Gey (11) montrait que des valeurs plasmatiques en vitamines C et E inférieures de 25 à 30 % par rapport à une valeur seuil (8,8 à 10,5 µg/ml pour la vitamine C et 13 µg/ml pour la vitamine E) sont associées à un doublement du risque de présenter un cancer ou une affection cardiovasculaire. Cette étude et d'autres indiquent aussi qu'il existe une concentration plasmatique limite en β-carotène en-dessous de laquelle un risque accru de développer des cancers.

L'ensemble de ces données ont conduit aux lancements d'études d'intervention avec des compléments en antioxydants. Dans un contexte de prévention primaire, onze études essentielles ont été réalisées entre 1993 et 2001. La toute première fut lancée en 1993 chez 30.000 adultes de 40 à 60 ans vivant en Chine dans la région de Linxian où l'incidence des cancers de l'estomac était tout particulièrement élevée (Linxian Intervention Trials). Au bout de 5 ans, chez les sujets ayant reçu quotidiennement une combinaison de 15 mg de β-carotène, de 30 mg de vitamine E et 50 µg de sélénium, on observait une diminution significative de 9% de la mortalité totale, mais surtout, de celle faisant suite à un cancer de l'estomac (30).

Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par la suite avec les études ATBC et CARET; celles-ci ont abouti à une augmentation respective de 16 et 28% de l'incidence de cancer du poumon chez de grands fumeurs ayant pris ce type d'antioxydant (31, 32). Dans ces deux études, le β-carotène avait été administré quotidiennement à des doses de l'ordre de 20-30 mg, en combinaison ou non avec de la vitamine A (25.000 UI), c'est-à-dire à des doses largement supérieures aux apports journaliers recommandés. Les résultats de ces études ont jeté un énorme émoi dans la communauté scientifique alors qu'ils pouvaient s'expliquer de façon très logique. Avec ce type d'apport, en effet, la concentration plasmatique du β-carotène est augmentée de 18 fois, de sorte que l'équilibre fragile de synergie des antioxydants est bouleversé et que le β-carotène devient lui-même un agent pro-oxydant. Une autre explication très logique est liée au fait que les EOA ont des rôles physiologiques comme, par exemple, celui de réguler l'apoptose. Ainsi,

administrer un seul antioxydant à forte dose ne pouvait qu'être néfaste, *a fortiori* chez de grands fumeurs à haut risque de développer un cancer du poumon et qui présentent peut-être au départ un cancer occulte *in situ*. Mais, il est vrai qu'à l'époque, l'effet physiologique des EOA n'était pas encore connu.

De façon générale, force est de reconnaître que les études d'intervention longitudinales ultérieures ont donné des résultats assez décevants tant dans la prévention des cancers que dans la réduction des accidents cardiovasculaires. Avec le recul nécessaire, ceci peut en partie s'expliquer par l'étude de populations non comparables entre elles (population générale ou population à haut risque de pathologies; sujets déficients ou bien nourris), par des doses variables pour la complémentation (niveau nutritionnel ou pharmacologique), par le nombre de nutriments antioxydants testés (un, deux ou plus) et enfin par le type d'administration (antioxydant seul ou dans le cadre d'une association équilibrée).

L'année dernière, la méta-analyse de Bjelakovic et al. a de nouveau semé un énorme doute quant aux effets protecteurs des antioxydants pris sous forme de complément. Dans un article publié dans le JAMA (33) et qui faisait suite à un autre papier paru dans le Lancet (34), les auteurs concluaient que la prise de compléments en antioxydants, plus particulièrement les vitamines C et E, le β -carotène et le sélénium, «semble» augmenter la mortalité. Ces résultats ont été très fortement critiqués dans la mesure où les auteurs n'ont sélectionné que 68 études sur les 815 disponibles dans la littérature, sélection faite sur base de leurs propres critères pour définir une étude bien ou mal menée. Pour des raisons incompréhensibles, n'ont pas été reprises dans cette analyse des études aussi sérieuses que celle de Linxian et, plus récemment, celle de GISSI menée en Italie qui avaient démontré une diminution significative de la mortalité. Sur les 68 études retenues, les auteurs estiment que 47 ont été très bien conduites et 21 médiocrement construites. Pour ces 21 études, une diminution de la mortalité de 9% a été observée, et c'est finalement sur la base des 47 études restantes que les auteurs arrivent aux conclusions suivantes : augmentations de la mortalité de 7% pour le β -carotène, de 16 % pour la vitamine A, de 4% pour la vitamine E, et de 6 % non significative pour la vitamine C, avec cependant un effet protecteur non significatif de 10 % pour le sélénium. Ce que Bjelakovic et al. oublient de préciser, c'est que cette hausse de mortalité n'était uniquement observée qu'avec des antioxydants utilisés à très fortes doses (e.g. vitamine E >

200 UI) (35). En soi, les résultats de cette méta-analyse n'étaient donc pas nouveaux puisque les scientifiques savaient depuis longtemps qu'un antioxydant à forte dose peut devenir un agent pro-oxydant et, donc, potentiellement dangereux pour la santé.

Revenons un peu en arrière. Suite aux résultats désastreux des études CARET et ABTC, des chercheurs français et belges se penchèrent plus sérieusement sur la notion de dose nutritionnelle ainsi que sur la meilleure combinaison possible d'antioxydants à utiliser de façon à respecter un effet de synergie optimale. De là est née SUVI-MAX, étude randomisée et placebo-contrôlée réalisée sur une population de 7.887 femmes (35-60 ans) et 5.141 hommes (45-50 ans) et qui a démarré en 1995 (36). Durant 7,5 ans, son but était de tester l'impact d'un apport d'un complexe d'antioxydants et d'oligo-éléments à doses nutritionnelles (β -carotène : 6 mg/j, vitamine C : 120 mg/j, vitamine E : 30 mg/j, sélénium : 100 μ g/j et zinc : 20 mg/j) sur l'incidence des cardiopathies ischémiques et des cancers. Afin d'être le plus objectif possible, nous transcrivons ici *in extenso* les commentaires de Herberg, responsable de cette étude, et qui ont été publiés en 2006 (37).

«Aucun effet de la complémentation n'a été retrouvé pour les maladies cardiovasculaires. En revanche, un apport adéquat de vitamines et minéraux antioxydants pendant 7,5 ans réduit l'incidence des cancers, tous sites confondus, de 31 % (et de 37 % du risque de décès), mais cette réduction ne concerne que les hommes chez qui l'on constate également des apports nutritionnels moyens plus faibles en antioxydants. Chez les femmes dont le statut initial en antioxydants est meilleur que celui des hommes, l'effet de l'intervention n'est pas décelable, voire s'accompagne d'un effet défavorable pour le cancer de la peau. Les effets différents observés dans notre étude et les apparentes contradictions avec les résultats des autres essais d'intervention et de multiples études d'observation suggèrent que les actions réelles des antioxydants peuvent être modulées par les doses utilisées (nutritionnelles *versus* pharmacologiques), le statut basique en antioxydants des sujets (différent selon le sexe ou le statut nutritionnel) et leur état de santé (sujets sains *versus* à risque). De fortes doses d'antioxydants peuvent être délétères chez les sujets à haut risque ou ayant un cancer infra-clinique».

Tout est dit dans ce résumé. Prendre un complexe d'antioxydants à des doses nutritionnelles apporte un avantage chez les sujets qui présentent des valeurs sanguines basses en antioxydants. C'est le cas, par exemple, des hommes qui man-

gent nettement moins de fruits et légumes que les femmes. L'augmentation de cancers de la peau dans un sous-groupe de femmes démontre par contre qu'une prise chronique d'antioxydants à des doses nutritionnelles est potentiellement néfaste lorsque les apports alimentaires en antioxydants sont adéquats. Cet aspect essentiel n'avait jamais été démontré auparavant.

Toutes ces observations montrent la nécessité de connaître le statut sanguin en antioxydants d'un sujet (voir plus loin) avant de lui conseiller une supplémentation en antioxydants, quelle que soit sa nature. Un exemple à propos du sélénium, un oligo-élément nécessaire pour le bon fonctionnement de la glutathion peroxydase, illustre ce concept. Le groupe de Clark (38) a montré que la prise journalière de sélénium (200 µg), réduit après 8 ans l'incidence de cancer de tous types par rapport à un groupe placebo. Cependant, l'effet préventif est le plus marqué chez les sujets dont la valeur plasmatique en sélénium est inférieure à 106 µg/L au départ de l'étude. L'effet protecteur diminue lorsque les taux sont compris entre 105 et 121 µg/L et une augmentation de la fréquence des cancers est observée lorsque le taux en sélénium de départ dépasse 121 µg/L dans le groupe supplémenté. Ces résultats démontrent clairement qu'il doit exister des valeurs plasmatiques discriminantes pour décider si une supplémentation est opportune ou non.

LE CONCEPT 0 – 5 – 30 : NOTRE MEILLEURE DÉFENSE ANTIOXYDANTE NATURELLE

La fumée de cigarette contient jusqu'à plusieurs milliards d'EOA et les fumeurs présentent un stress oxydant élevé. Chez ceux-ci, le taux plasmatique de vitamine C est environ 30% plus bas que chez les non-fumeurs tandis que les dommages oxydatifs au niveau des lipides (reflétés notamment par le dosage des isoprostanes) tendent à être plus élevés que chez les non-fumeurs (39). En matière de lutte contre le stress oxydant, le tabagisme doit donc être proscrit (d'où le 0).

Contrairement aux études avec supplémentation, toutes les études longitudinales montrent qu'un taux élevé d'antioxydants obtenu grâce à une alimentation riche en fruits et légumes réduit le risque relatif de mortalité dans diverses pathologies : cancers, maladies cardiovasculaires, et bronchopneumopathie par exemple (40). En Belgique comme en France existent des Plans Nationaux Nutrition Santé qui préconisent de manger au moins 5 fruits et légumes par jour, soit l'équivalent de 600 grammes de ces deux types

TABLEAU I. LA GRANDE FAMILLE DES POLYPHÉNOLS

Famille	Principaux composés	Origine
acide hydroxy-benzoïques	acide vanillique acide gallique	vanille feuilles de thé
acides hydro-cinnamiques	acide caféique acide férulique acide chlorogénique resvératrol (stilbène)	café riz, blé, asperges pelure de pomme de terre, pomme, artichaut, raisin, vin
flavanoïdes - flavonols - flavones - flavanones - flavones-3-ols - isoflavones - anthocyanidines	quercétine, kaempférol luéoline, apigénine naringénine catéchine, épicatechine génistéine, daidzéine cyanidine	oignon, brocoli céleri agrumes raisin, thé vert, chocolat, soja fruits rouges, raisin
tannins hydrosolubles ou non	polyphénols de haut poids moléculaire	
lignines	lignane	bois

d'aliments combinés. L'étude ELAN (Etude Liégeoise sur les Antioxydants) menée sur 900 personnes vivant en Province de Liège montre toutefois que plus de 20 % de la population étudiée ne respectent pas ces consignes (41), ce qui est en accord avec les données nationales.

Si l'aspect quantitatif (5 fruits et légumes par jour) est important, l'aspect qualitatif l'est également. Outre de l'eau, du magnésium, du potassium, des folates et des fibres solubles et insolubles, les fruits et légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, les caroténoïdes et, surtout, les polyphénols (42). Comme le montre le tableau I, les polyphénols sont divisés en sous-familles qui sont composées chacune de plusieurs centaines de molécules différentes. Ces sous-familles sont plus ou moins spécifiques des fruits et légumes, selon leur couleur : rouge, vert, jaune, bleu et le blanc. Une pomme verte, par exemple, ne contient pas les mêmes polyphénols, et si c'est le cas, pas en même quantité qu'une prune ou une orange. Il faut donc varier les couleurs dans l'alimentation afin d'ingérer un maximum de polyphénols appartenant à ces différentes sous-familles. Plusieurs études épidémiologiques montrent notamment que c'est essentiellement l'apport des flavanones présents dans les agrumes qui réduit l'incidence du cancer de l'œsophage (43) tandis que ce sont plutôt les flavones et les flavanols qui sont actifs pour prévenir le cancer du rein (44). Au niveau cardiovasculaire, ce sont essentiellement les anthocyanes et non les autres

flavonoïdes qui ont un effet protecteur (45). Des couleurs variées dans l'assiette sont donc de mise pour notre santé. Le vin rouge très riche en catéchines ne doit pas être oublié pour ses effets cardio-protecteurs à condition d'être consommé de façon très modérée (125 mL/jour).

Le chiffre 30 renvoie à la pratique d'une activité physique régulière mais modérée (marche, vélo de tourisme, danse, ..). Plusieurs travaux ont montré que le sport pratiqué de cette façon permet de renforcer l'immunité mais aussi de stimuler les défenses antioxydantes (46). Inversement, le sport pratiqué en excès est générateur d'un stress oxydant chronique indésirable.

La récente étude Interheart (47, 48) menée sur 52.000 personnes réparties dans les cinq continents du monde entier montre les effets bénéfiques du concept 0 – 5 – 30 chez des patients admis en unité cardiologique pour angine de poitrine. Le fait de ne pas fumer, de consommer 5 fruits et légumes par jour et de pratiquer une activité physique d'au moins 30 minutes réduit au total de 47 % le risque d'issue fatale chez ces patients.

Au vu des ces données, il est incontestable que c'est par notre alimentation, mais aussi par une hygiène de vie appropriée que nous pourrions bénéficier des effets protecteurs des antioxydants naturels. Par ailleurs, l'évaluation des effets physiologiques des polyphénols est possible en clinique. En effet, les polyphénols sont vasodilatateurs, car capables de stimuler de façon modérée la production de NO par les cellules endothéliales. Cet effet vasorelaxant s'observe notamment dans les minutes qui suivent l'ingestion de vin rouge et de chocolat noir (49, 50), deux aliments connus pour leur richesse respective en catéchines et en flavanols. Chez des sujets sains, l'étude DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) a évalué les effets d'un régime riche en fruits et légumes et pauvre en graisses, et montré une réduction significative des pressions sanguines systoliques et diastoliques (51). Dans une autre étude portant sur 690 sujets sains qui ont été incités pendant 6 mois à consommer 5 fruits et légumes par jour, un effet positif a été trouvé entre l'amélioration de la pression sanguine et le taux d'antioxydants circulants résultant de cet apport riche en antioxydants naturels (52).

UTILITÉ D'UN BILAN SANGUIN DE STRESS OXYDANT

Vu la complexité du phénomène, la détection d'un stress oxydant chez un individu donné n'est en aucun cas réalisable par une seule analyse. Par ailleurs, chaque méthode de la plus simple (mesure

d'une capacité antioxydante totale) à la plus compliquée (puce ADN) a également ses propres spécificités et limites. De façon générale, quatre grands axes d'analyses sont retenus : 1) mesure des antioxydants, 2) détermination de certains oligo-éléments, 3) évaluation des dommages oxydatifs, 4) identification des sources responsables d'une production accrue d'EOA (9).

La réalisation correcte de tous ces dosages repose impérativement sur un traitement particulièrement soigné des échantillons sanguins (centrifugation immédiate, congélation ...). Force est de constater que ceci est malheureusement très loin d'être systématiquement la règle. Ces précautions analytiques qui relèvent des bonnes pratiques de laboratoire sont notamment basées sur les trois considérations suivantes. Premièrement, 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, deux antioxydants majeurs, sont particulièrement labiles, il n'est pas donc difficile d'imaginer les conséquences d'un traitement non adéquat de l'échantillon. Deuxièmement, les scientifiques savent depuis longtemps que beaucoup de marqueurs d'oxydation (notamment au niveau des lipides) se dégradent très vite en sous-produits dans le tube sanguin. Troisièmement, les globules blancs produisent naturellement et en permanence des EOA. Ils peuvent même être activés par certains anticoagulants comme l'héparine, ce qui représente donc une source *ex vivo* non désirable de production d'EOA dans le tube sanguin.

C'est sur la base d'une approche analytique aussi rigoureuse qu'ont pu être établies valablement des valeurs de référence pour chacun des paramètres liés à la mesure du stress oxydant chez un individu (9). De tels outils sont donc susceptibles d'apporter aux professionnels de la santé (médecins, pharmaciens, diététiciens, ...) des informations intéressantes concernant l'impact de notre alimentation et de notre mode de vie sur notre état de stress oxydant et donc sur notre santé.

CONCLUSION

Dans l'état actuel des connaissances, nous pouvons avancer les certitudes suivantes concernant le stress oxydant et les antioxydants :

1° l'oxydation des lipides et celle de l'ADN via la formation de dérivés toxiques de l'oxygène sont respectivement impliquées dans le développement de maladies cardiovasculaires et du cancer. Le rôle du stress oxydant dans la relation syndrome méta-

bolique – diabète de type II – maladies cardiovasculaires est de plus en plus établi;

2° sans exception, toutes les études épidémiologiques montrent que plus le taux en antioxydants d'un individu est bas, plus le risque de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer est accru;

3° l'étude SUVIMAX confirme la protection offerte vis-à-vis effet du cancer de la prostate par un cocktail d'antioxydants pris à des doses nutritionnelles lorsque le taux sanguin en antioxydants est naturellement bas au départ. On ne peut cependant extrapoler ces données à d'autres types et concentration d'antioxydants que ceux utilisés dans cette étude;

4° chez des sujets présentant par contre un statut en antioxydants équilibré, aucune étude n'a pas pu démontrer à ce jour un effet protecteur des antioxydants accru par rapport à un placebo. Des effets négatifs peuvent être observés à de fortes doses (augmentation faible de la mortalité) et même, comme le montre l'étude SUVIMAX, à des doses nutritionnelles prises de façon chronique sur de longues durées (augmentation non systématique de l'incidence de cancer de la peau chez les femmes);

5° à ce jour, il n'y a pas d'«evidenced based medicine» montrant un effet curatif de quelque antioxydant que ce soit;

6° une consommation quotidienne de 5 portions de fruits et légumes riches en antioxydants, et tout particulièrement en polyphénols, apparaît de plus en plus comme étant la première étape de prévention contre l'apparition de diverses maladies dont la fréquence augmente lors du vieillissement. Des effets cliniques intéressants (réduction de l'hypertension par exemple) sont observables avec ce type de régime chez des sujets sains et chez les patients souffrant d'un diabète sucré;

7° un bilan sanguin de stress oxydant réalisé selon les bonnes pratiques de laboratoire s'avère utile afin de ne pas démarrer à l'aveugle un éventuel traitement par des antioxydants (ou oligo-éléments) sous forme de compléments. Ces bilans permettent aussi l'identification de sources de stress oxydant (alimentation pauvre en fruits et légumes, glycémie élevée, inflammation chronique, ...).

BIBLIOGRAPHIE

- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW et al.— Oxygen poisoning and X – irradiation : a mechanism in common. *Science*, 1954, **119**, 623-626.
- Harman D.— Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Geront*, 1956, **11**, 298-300.
- McCord JM, Fridovich I.— Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969, **244**, 6049-6055.
- Reinke LA, Janzen EG.— Detection of spin adducts in blood after administration of carbon tetrachloride to rats. *Chem Biol Interact*, 1991, **78**, 155-165.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al.— Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**, 4695-4699.
- Pincemail J, Defraigne JO, Franssen C, et al.— Evidence of *in vivo* free radical generation by spin trapping with alpha-phenyl N-tert-butyl nitron during ischemia/reperfusion in rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*, 1990, **9**, 181-186.
- Coghlan JG, Flitter WD, Holley AE, et al.— Detection of free radicals and cholesterol hydroperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Free Radic Res Commun*, 1991, **14**, 409-417.
- Tortolani AJ, Powell SR, Misik V, et al.— Detection of alkoxy and carbon-centered free radicals in coronary sinus blood from patients undergoing elective cardioplegia. *Free Rad Biol Med*, 1994, **14**, 421-426.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, et al.— Le stress oxydant. *Rev Med Liège*, 2007, **62**, 628-638.
- Cillard J, Cormier M, Girre RL.— Autoxidation rate increase of linoleic acid in the presence of tocopherol in aqueous medium ; study of the transformation of tocopherol. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 1975, **281**, 455-458.
- 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.
- Azzi A, Ricciarelli R, Zingg JM.— Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett*, 2002, **519**, 8-10.
- Sies H.— Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, 1991, **91**, 31S-38S.
- Magder S.— Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*, 2006, **10**, 208-216.
- Ceriello A.— Oxidative stress, insulin resistance and cardiovascular disease. Oxidative stress, disease and cancer. Ed KK Singh, Imperial College Press, NY, USA, 2006, 537-556.
- Bordenave S, Metz L, Flavier S, et al.— Training-induced improvement in lipid oxidation in type 2 diabetes mellitus is related to alterations in muscle mitochondrial activity. Effect of endurance training in type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 2008, **34**, 162-168.
- Gable DR, Stephens JW, Copper JA, et al.— Variation in the UCP2-UCP3 gene cluster predicts the development of type 2 diabetes in healthy middle-aged men. *Diabetes*, 2006, **55**, 1504-1511.
- Wautier MP, Massin P, Guillausseau PJ, et al.— N(carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 2003, **29**, 44-52.
- Hudson BI, Wendt T, Bucciarelli LG, et al.— Diabetic vascular disease : it's all the RAGE. *Antiox Rep Signal*, 2005, **7**, 1588-1600.
- Esper RJ, Vilarino JO, Machado RA, Paragano A.— Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol*, 2008, **45**, 17-43.
- Ellis A and Triggle CR.— Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, **81**, 1013-1028.

22. Ross R.— Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**, 115-126.
23. Alexanderson E, Rodriguez-Valero M, Martinez A, et al.— Endothelial Dysfunction in Recently Diagnosed Type 2 Diabetic Patients Evaluated by PET. *Mol Imaging Biol*, 2008. In presse, available on Pubmed.
24. Suzuki T, Hirata K, Elkind MS, et al.— Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular disease : the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Am Heart J*, 2008, **15**, 405-410.
25. Widlansky ME, Golce N, Keaney JF, Vita JA.— The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **42**, 1149-1160.
26. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ.— Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*, 2003, **108**, 2054-2059.
27. Block G, Patterson B, Subar A.— Fruit, vegetables, and cancer prevention : a review of epidemiological evidence. *Nutrition and cancer*, 1992, **18**, 1-29.
28. Lunet N, Lacerda-Viera A, Barros H.— Fruit and vegetables consumption and gastric cancer : a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutrition and cancer*, 2005, **53**, 1-10.
29. Neve J et Pincemail J.— Antioxydants alimentaires : vitamines, oligo-éléments et non-nutriments. *Aliments fonctionnels*. Ed Roberfroid, Coxam, Delzenne. Lavoisier, 2008, 203-241.
30. Blot W, Li JY, Taylor P, et al.— Nutrition intervention trials in Linxian, China : supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease – specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85**, 1483-1491.
31. Heinonen O, Albanes D.— The effect of vitamin E and β – carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*, 1994, **330**, 1029-1035.
32. Omenn G, Goodman G, Thornquist M, et al.— Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996, **334**, 1150-1155.
33. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al.— Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention : systematic review and meta – analysis. *JAMA*, 2007, 842-857.
34. Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti RG, Gluud C.— Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers : a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2007, **297**, 842-857.
35. Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, et al.— Meta – analysis : high dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Inter Med*, 2005, **142**, 37-46.
36. Hercberg S, Galan P, Preziosi P, et al.— The SU.VI. MAX study : a randomized, placebo – controlled trial of the health effect of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Int Med*, 2004, **164**, 2335-2342.
37. Hercberg S.— Stress oxydant L'étude SU.VI.MAX, un essai contrôlé randomisé, en double aveugle, testant l'effet de la supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants sur la santé = The SU.VI.MAX study, a randomized, placebo-controlled trial on the effects of antioxidant vitamins and minerals on health. *Annales Pharmaceutiques françaises*, 2006, **64**, 397-401.
38. Duffield-Lillies AJ, Reid ME, Turnbull BW, et al.— Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers and prevention*, 2002, **11**, 630-639.
39. Yan W, Byrd GD, Ogden MW.— Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *J Lipid Res*, 2007, **48**, 1607-1617.
40. 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 Clinique et Métabolisme*, 2007, **21**, 66-75.
41. Pincemail J, Degrune F, Voussure S, et al.— Intake of fruits and vegetables in men and women aged 40 – 60 years from the ELAN study. Communication au 2nd Congrès International de Nutrition, Dijon, France, 2007.
42. Ullah MF and Khan MW.— Food as medicine: potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pac J Canc Prev*, 2008, **9**, 187-196.
43. Rossi M, Garavello W, Tolamini R, et al.— Flavonoids and risk of squamous cell esophageal cancer *Int J Cancer*, 2007, **120**, 1560-1564.
44. Bosetti C, Rossi M, McLaughlin JK, et al.— Flavonoids and the risk of renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, **16**, 98-101.
45. Tavani A, Spertini L, Bosetti C, et al.— Intake of specific flavonoids and risk of acute myocardial infarction in Italy. *Public Health Nutr*, 2006, **9**, 369-374.
46. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J.— Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 2008, **44**, 126-131.
47. Yusuf S, Hawkan S, Ounpuu S.— Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 2004, **364**, 937-952.
48. Scheen AJ, Kulbertus H.— Interheart : nine risk factors predict nine out of ten myocardial infarctions. *Rev Med Liège*, 2004, **59**, 676-679.
49. Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R.— Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 2001, **38**, 159-165.
50. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK.— Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens*, 2003, **21**, 2281-2286.
51. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek, E.— A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 1997, **336**, 1117-1124.
52. John HF, Ziebland S, Yudkin P et al.— Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure : a randomised control trial (n = 690). *Lancet*, 2002, **359**, 1969-1974.
53. Kohen R, Nyska A.— Oxidatio of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 202, **30**, 620-650.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr. J.O. Defraigne, Service de Chirurgie Cardiovasculaire et Laboratoire de Chirurgie expérimentale (CREDEC), CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique.