



Unilabs

Le Stress Oxydatif

A.R.L., Lausanne, mars 2010

Dr Méd. Dany Mercan
Unilabs

dany.mercan@unilabs.com



Plan

- Présentation et définition du stress oxydant
- Biologie du stress oxydant
- Interactions entre les nutriments et le stress oxydant: les carences et les excès
- Biologie clinique et stress oxydant

Radicaux libres et espèces réactives

- **Radicaux libres**: molécules très réactives qui présentent un (des) électron(s) non apparié(s) (état doublet): $\cdot\text{OH}$
- O_2 : biradical qui présente deux électrons non appariés, de spin parallèle (état **triplet** – conservation de spin). $\text{O}:\text{O}$ **Cet état limite la réactivité en empêchant une réaction directe et en imposant une barrière énergétique.**
- **Espèces réactives (ER)**: radicalaires ou non; ce sont des molécules à très haute réactivité. **ERO**, **ERN** et **ERCl** correspondent à O, N et Cl

Les principales espèces oxydantes

Reactive oxidant species

Radicals		Non-radicals	
Hydroxyl	$\bullet\text{OH}$	Peroxynitrite	ONOO^-
Alkoxyl	$\text{L(R)O}\bullet$	Hypochlorite	$^- \text{OCl}$
Hydroperoxyl ^a	$\text{HOO}\bullet$	Hydroperoxide ^b	L(R)OOH
Peroxyl	$\text{L(R)OO}\bullet$	Singlet oxygen	$^1\Delta\text{O}_2$
Nitric oxide ^c	$\text{NO}\bullet$	Hydrogen peroxide ^d	H_2O_2
Superoxide ^d	$\text{O}_2^{\bullet-}$		

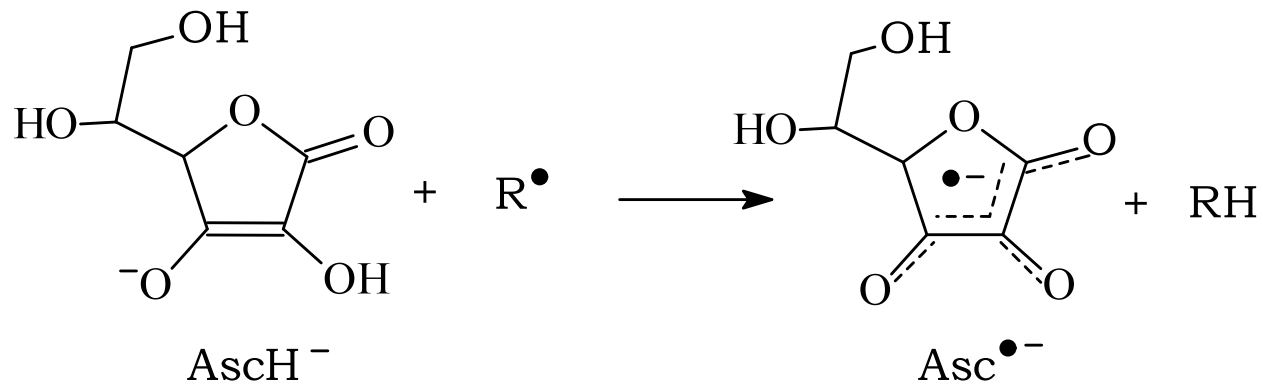
"Longevity" of reactive species

Reactive Species	Half-life
Hydrogen peroxide Organic hydroperoxides Hypohalous acids	~ minutes
Peroxyl radicals Nitric oxide	~ seconds
Peroxynitrite	~ milliseconds
Superoxide anion Singlet oxygen Alcoyl radicals	~ microsecond
Hydroxyl radical	~ nanosecond

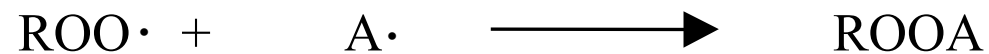
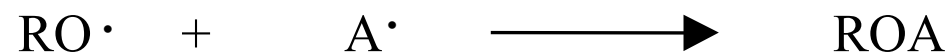
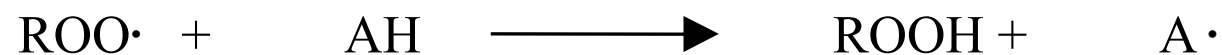
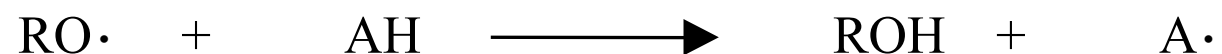
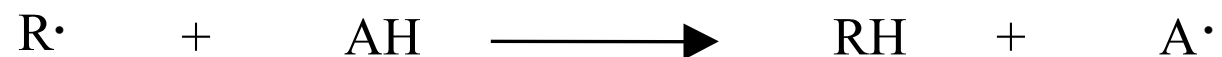
Définition d'un antioxydant

- N'importe quelle substance qui, lorsqu'elle est présente à une concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retarde de façon significative ou empêche l'oxydation dudit substrat.

Halliwell & Gutteridge (1999)

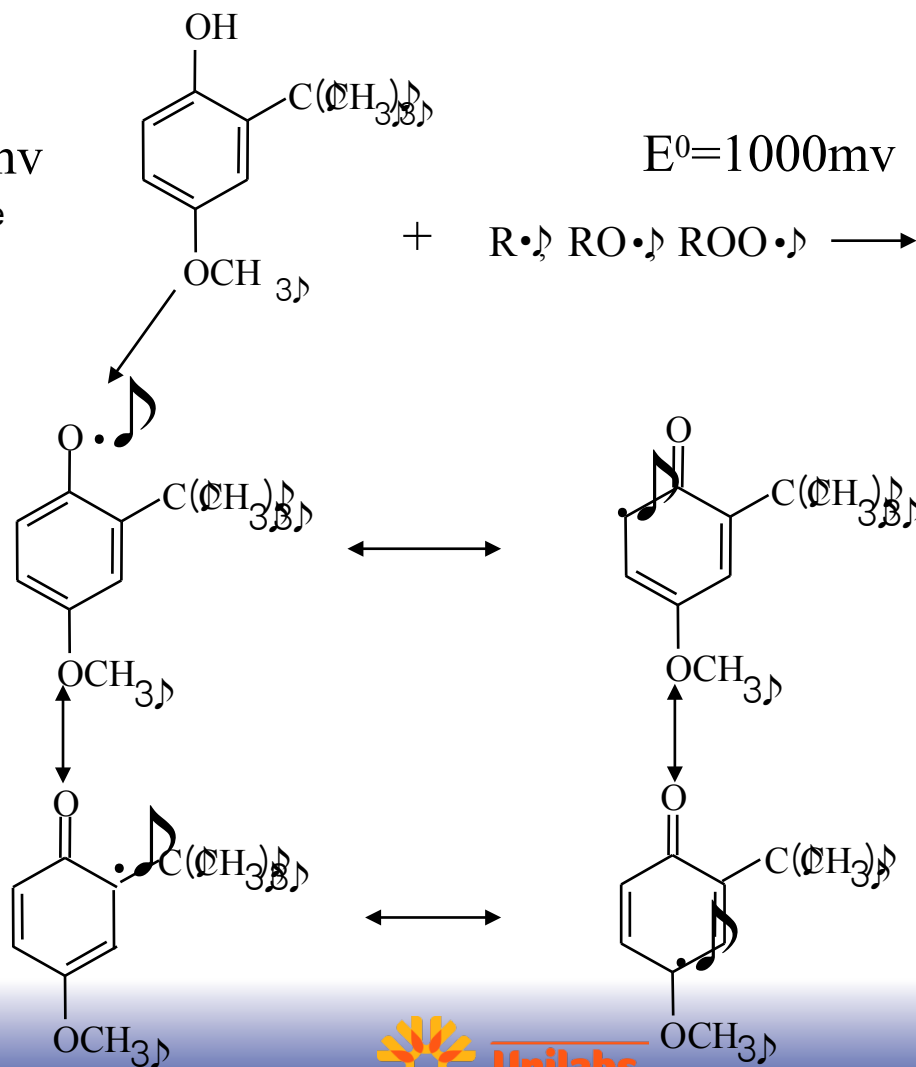


Action des antioxydants: terminaison

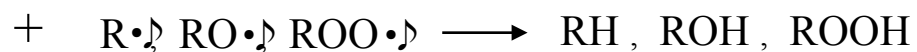


Action des antioxydants: stabilisation par résonance

$E^0 = 300-500\text{mv}$
Butyl hydroxy anisole



$E^0 = 1000\text{mv}$ ($K = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)



Potentiel de réduction dans les réactions à 1 électron

Composés		E° (mV)
HO·	H ⁺ / H ₂ O	2310
RO·	H ⁺ / ROH	1600
HOO·	H ⁺ / ROOH	1300
ROO·	H ⁺ / ROOH	1000
R·	H ⁺ / RH	600
Catéchol·	H ⁺ / Catéchol	530
α- Tocophéroxy·	H ⁺ / α- Tocophérol	500
Ascorbate·	H ⁺ / Ascorbate	282

Définition du stress oxydant

Stress oxydant: état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de l'organisme.

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente:

- Excès des espèces réactives de O_2 , N_2 ou Cl_2
- Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes)
- Mécanismes de réparation insuffisants

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais un mécanisme physiopathologique. Un excès d'espèces réactives mal maîtrisé favorisera une maladie ou un vieillissement accéléré.

Le terme stress oxydatif est un anglicisme.

Activité pro-oxydante des métaux de transition

Le contrôle de l'activité rédox des métaux est vital. On estime qu'en dehors des processus pathologiques il y a moins d'un atome de fer libre par cellule.

Production directe de radicaux alkyls (graisses, huiles)



Décomposition des hydroperoxydes en radicaux peroxydes ou alkoxydes.



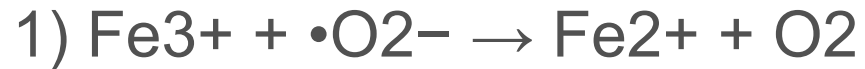
Le taux de peroxydation des lipides est maximal pour un rapport Fe (II):Fe(III) de 1:1.

Minotti, G. and Aust S.D. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1098-1104.

Activation de l'oxygène moléculaire puis production de singulet.



Le cycle d'Haber-Weiss: un concept périmé



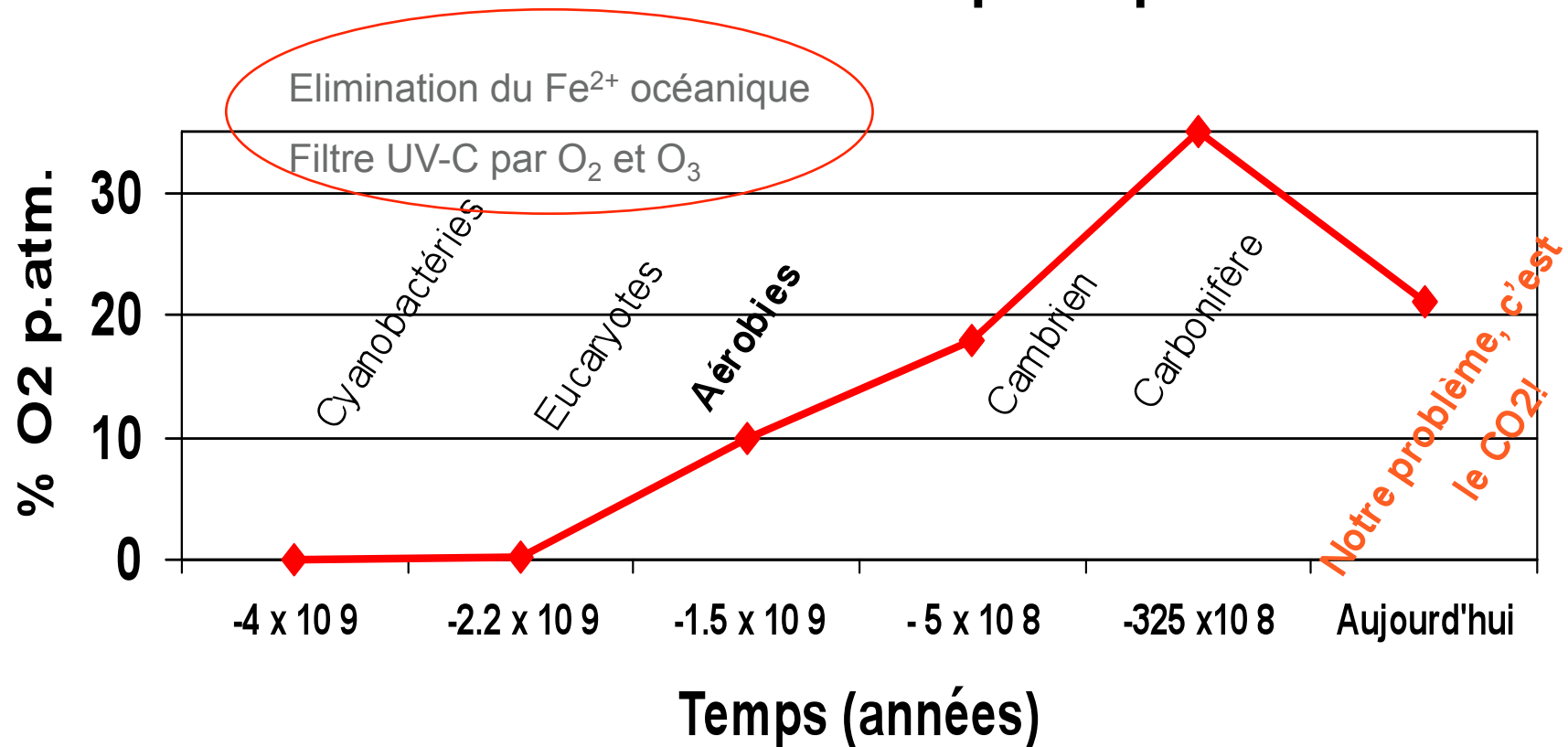
Réaction de Fenton

Réaction nette du cycle:



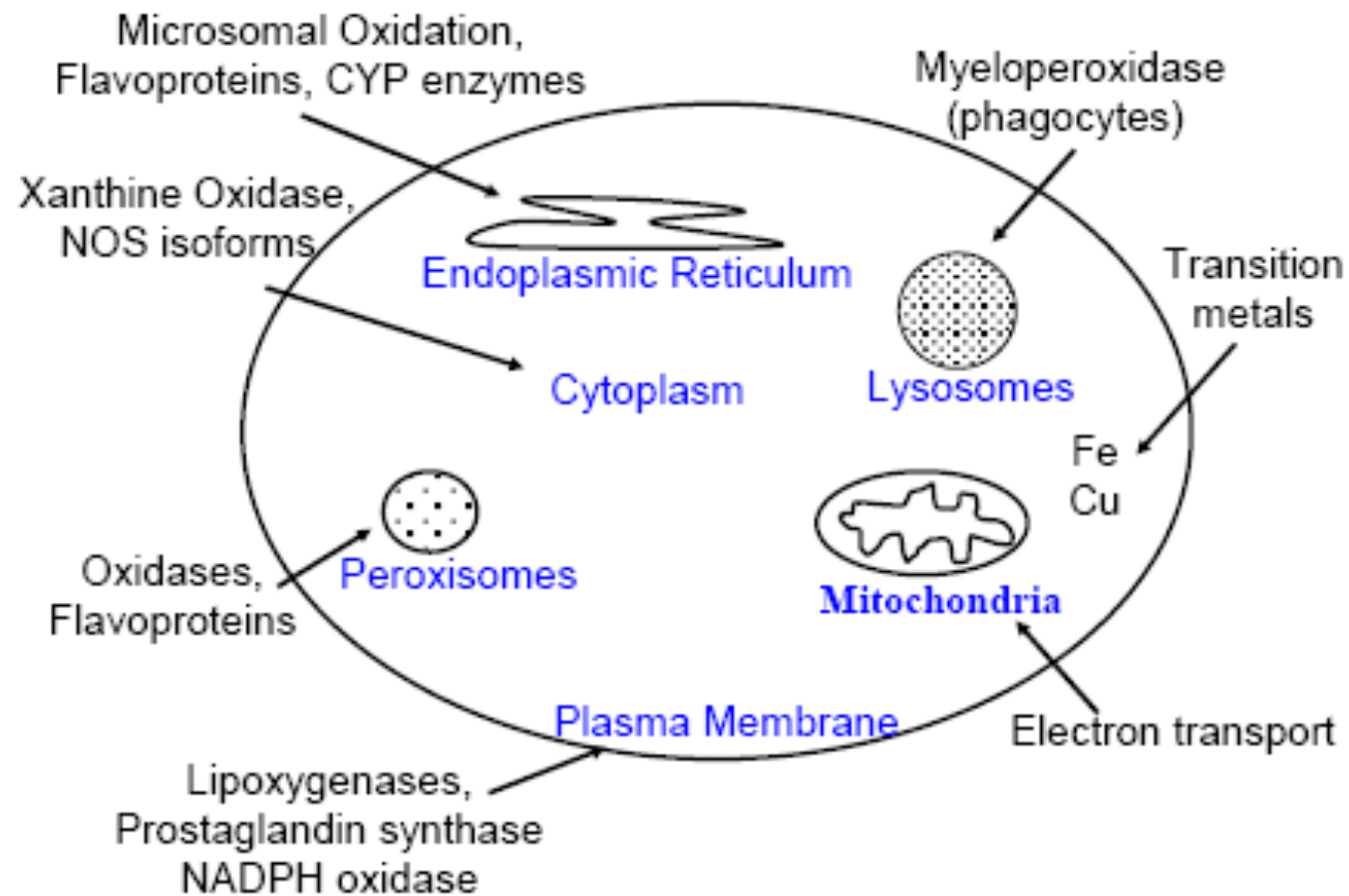
L'oxygène, un déchet indispensable

Evolution de l'O₂ atmosphérique



Sources endogènes d'espèces réactives

Endogenous sources of ROS and RNS



Mitochondrie: notre centrale « nucléaire » fuit...



Environ 1000/cellule

Multiples copies d'un mini-génome

Dépend aussi du génome externe

Chaîne respiratoire

Production d'énergie

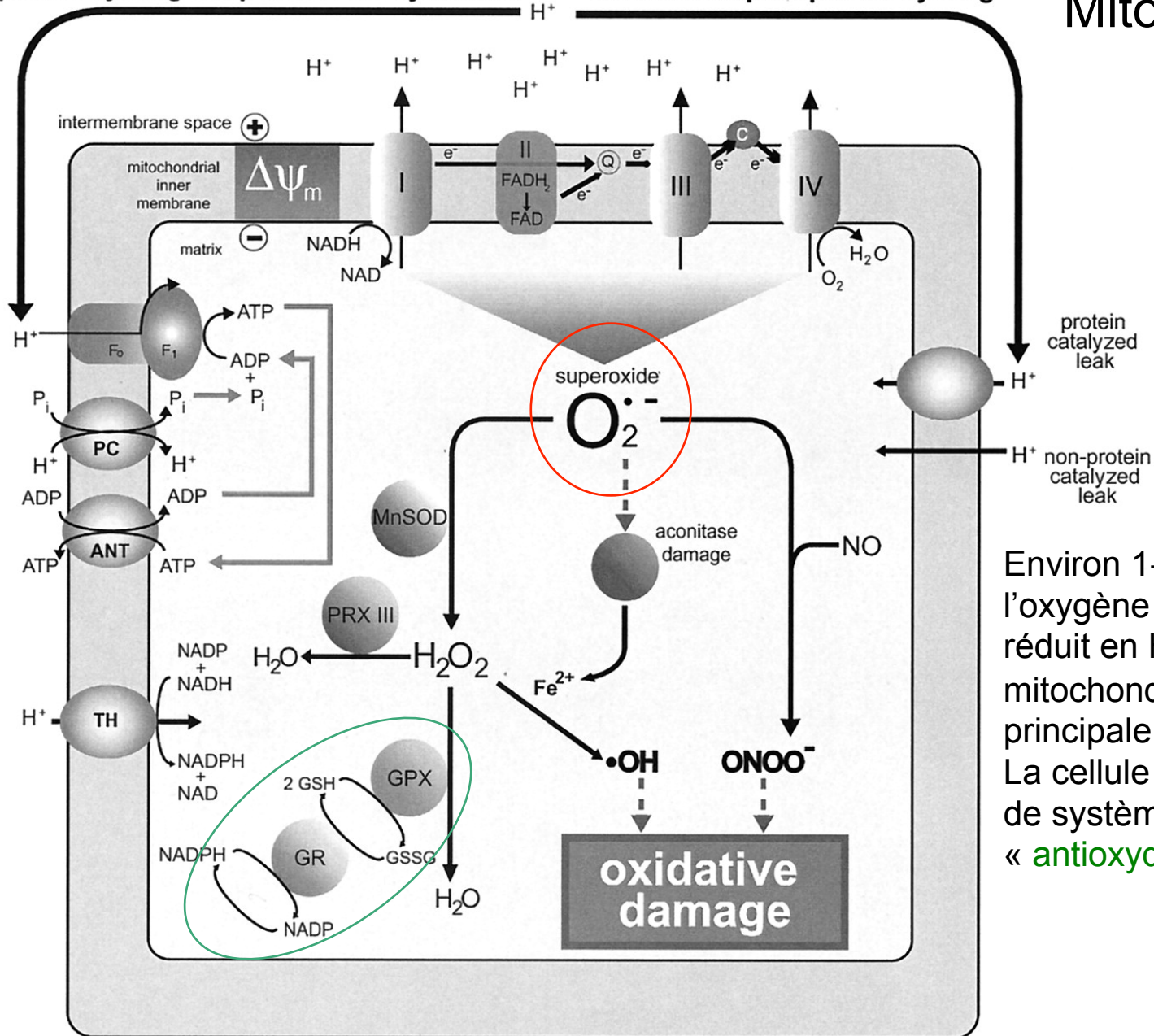
Production d'ERO

Lésions mt ADN >> ADN nucléaire

proton cycling coupled to ATP synthesis

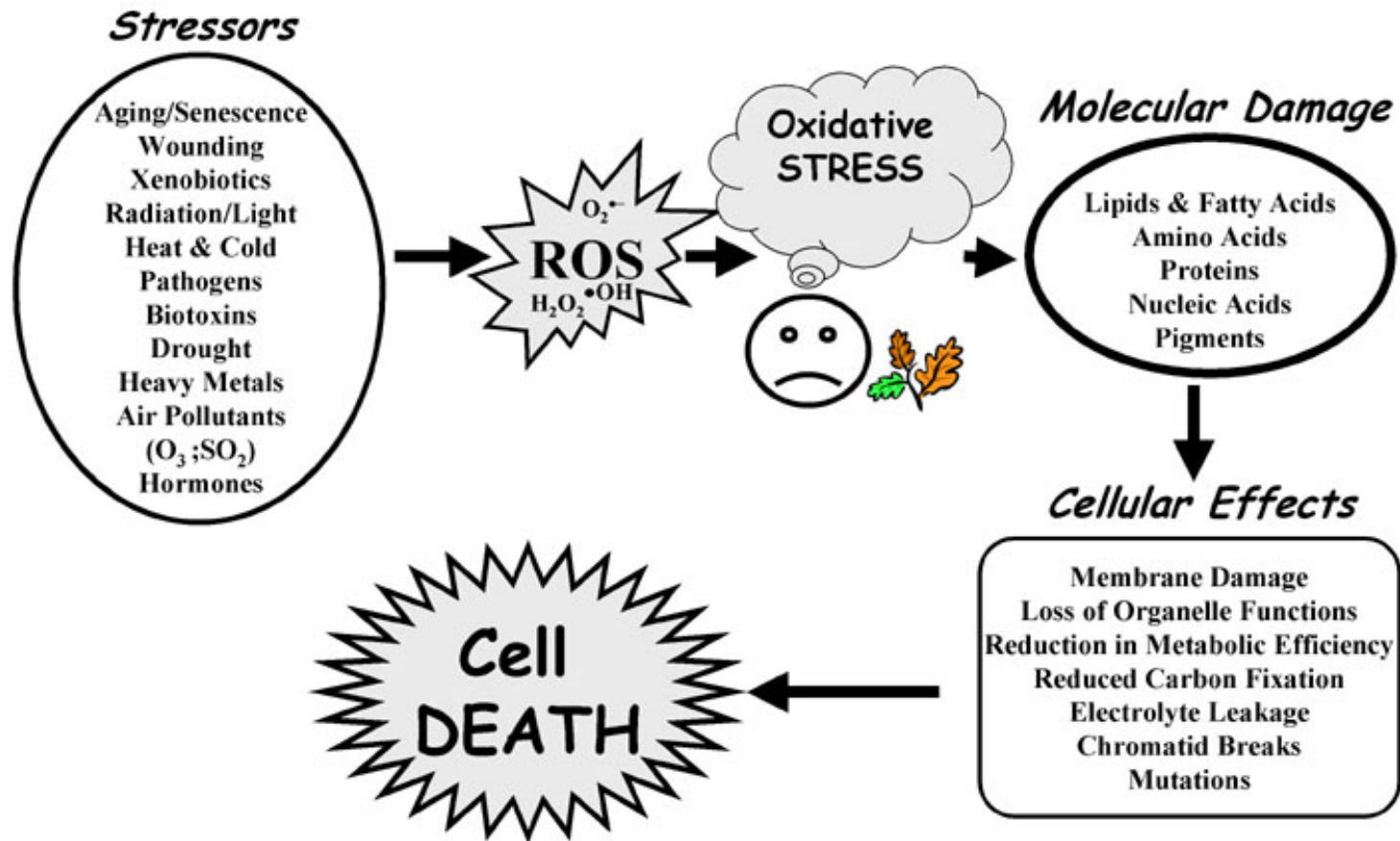
futile/uncoupled proton cycling

Mitochondrie



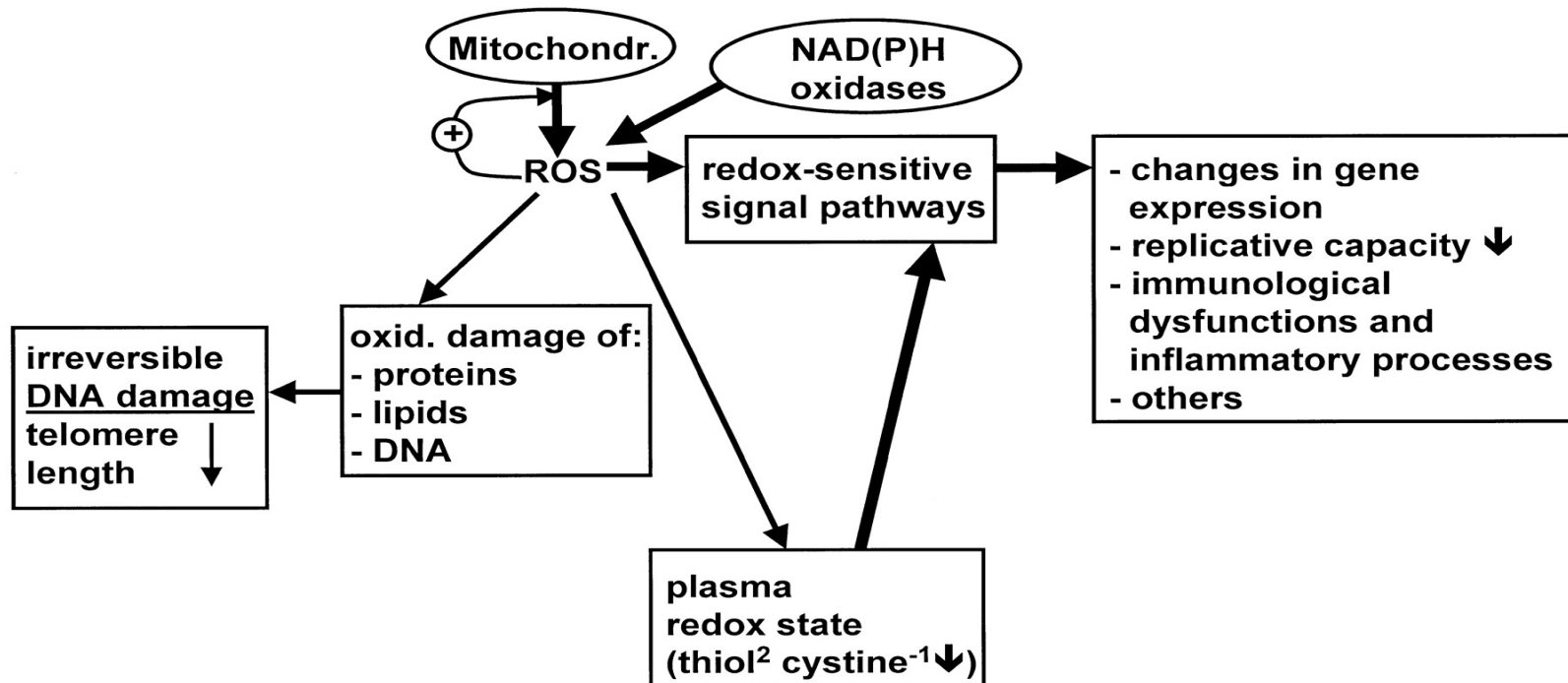
Environ 1-2 % de l'oxygène n'est pas réduit en H₂O. La mitochondrie est la principale source d'ERO. La cellule dispose donc de systèmes « antioxydants ».

Causes et conséquences du stress oxydant

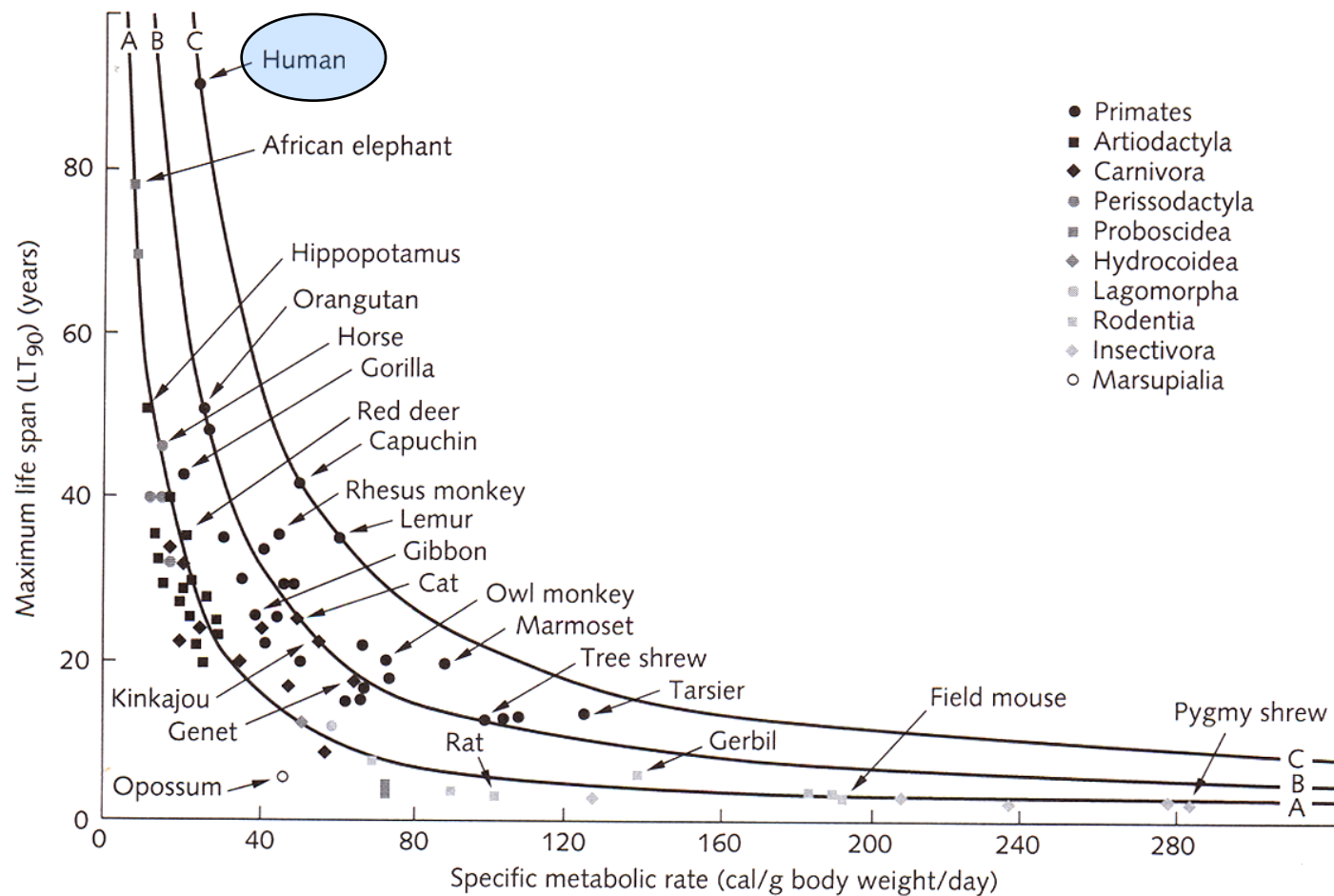


Stress oxydant et vieillissement

OXIDATIVE STRESS AND SENESCENCE: observed age-related changes and putative mechanisms



Taux métabolique spécifique et vieillissement



Conséquences biologiques du stress oxydant

Severity of
Oxidative Stress

Biological
Consequences

A. *Low level & gradual*

Aging

B. *Medium level & rapid*

*Carcinogenesis
Mutagenesis*

C. *Large level & rapid*

*Death, Stroke,
Trauma, Ionizing
irradiation*

Les défenses contre le stress oxydant

- ENZYMATIQUES

- Superoxyde dismutase
- Catalase
- Glutathion peroxydase
- Glutathion réductase
- Autres enzymes de phase 2
 - Glutathion S transférase
 - Thiorédoxine réductase
 - Hème oxygénase 1

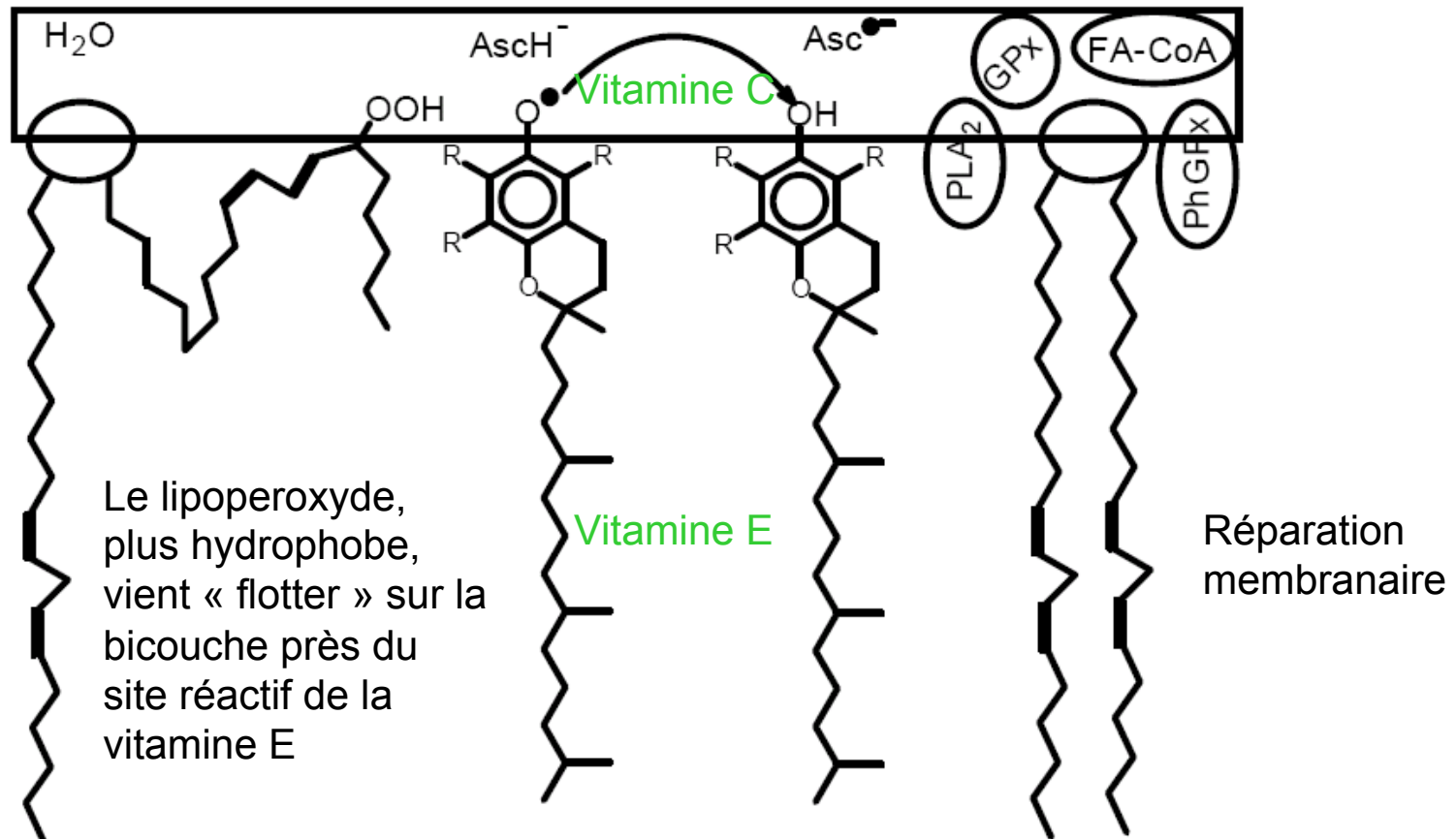
- NON-ENZYMATIQUES

- Protéines
 - Albumine
 - Céruloplasmine,...
- Hydrosolubles
 - Vitamine C
 - Glutathion
 - Acide urique
- Liposolubles
 - α -tocophérol
 - γ -tocophérol
 - Coenzyme Q10
 - Caroténoïdes
 - Polyphénols-flavonoïdes

Les enzymes de phase 2 sont
inductibles

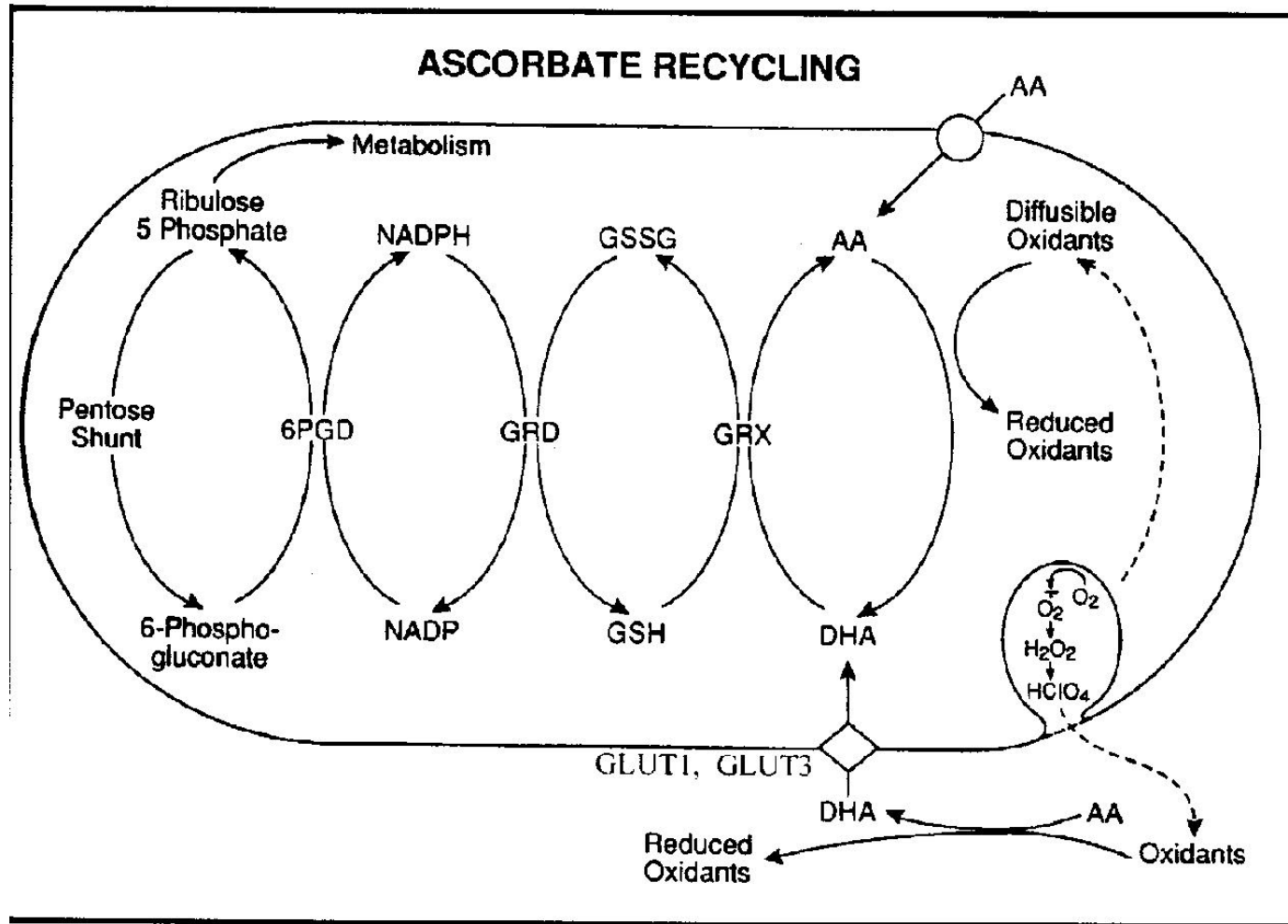
Interdépendance des systèmes antioxydants I

C and E as Co-Antioxidants

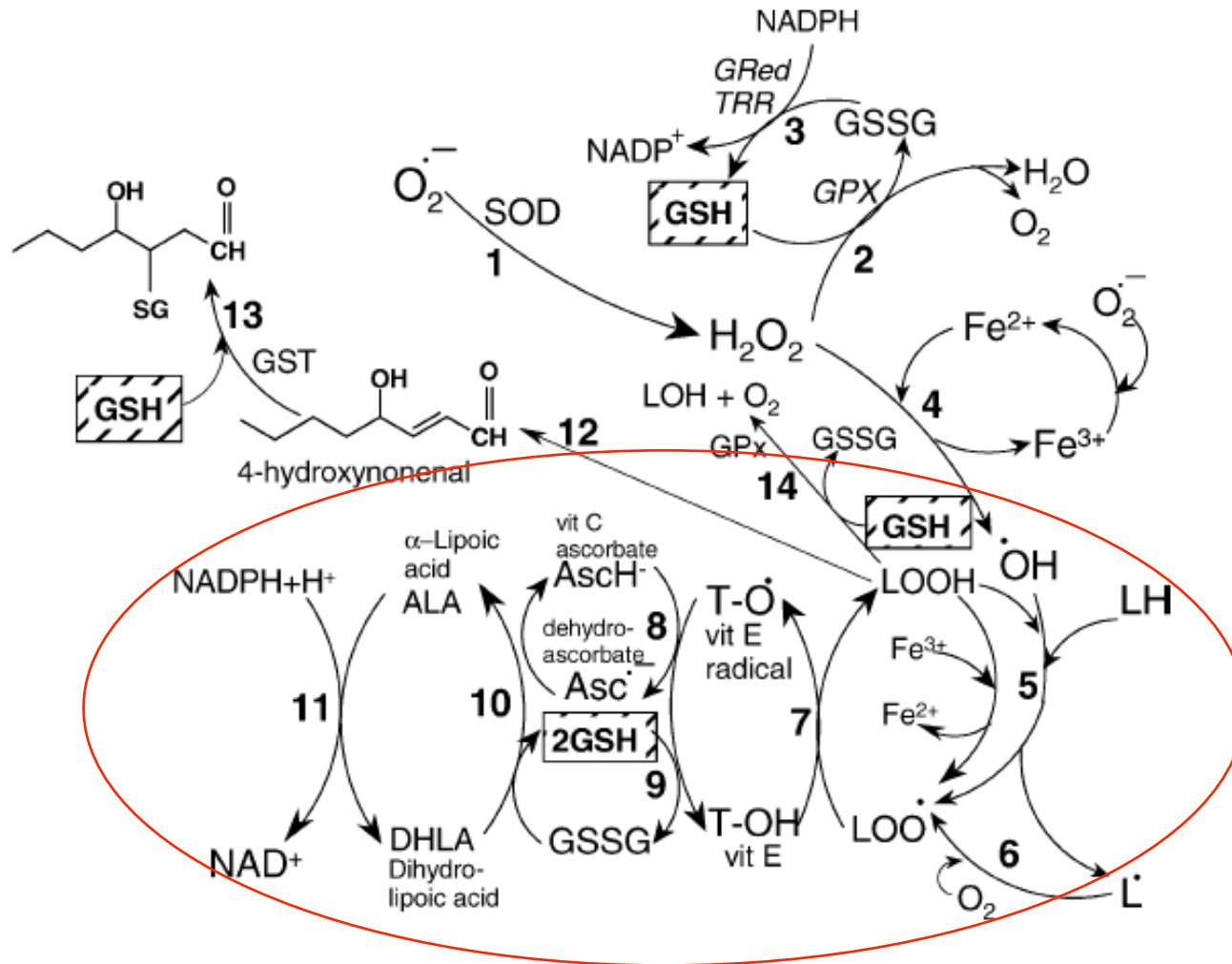


Buettner GR. (1993) *Arch Biochem Biophys.* **300**:535-543.

Interdépendance des systèmes antioxydants II

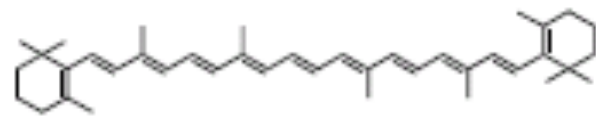


Interdépendance des systèmes antioxydants III

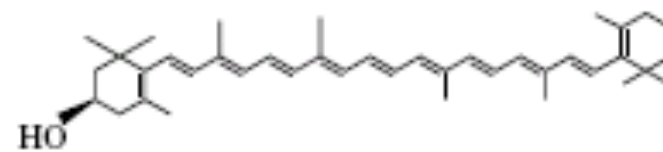


Valko M et al *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006) 1–40

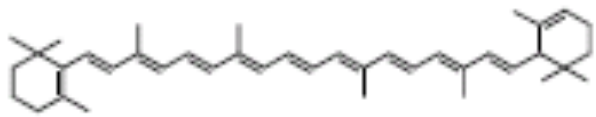
Les caroténoïdes et xanthophylles



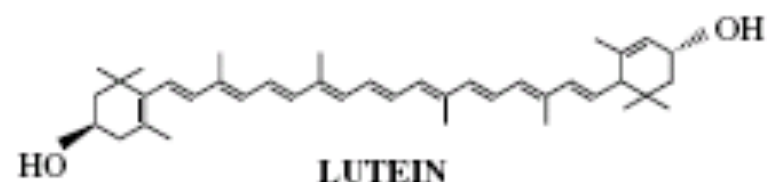
β-CAROTENE



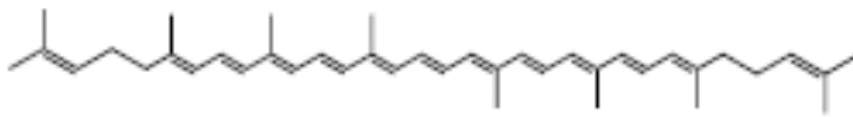
β-CRYPTOXANTHIN



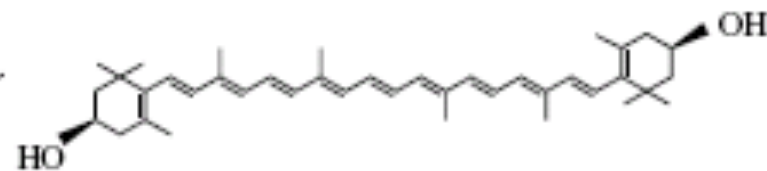
α-CAROTENE



LUTEIN

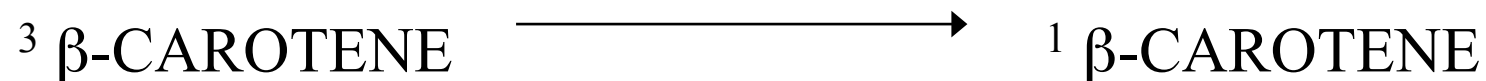
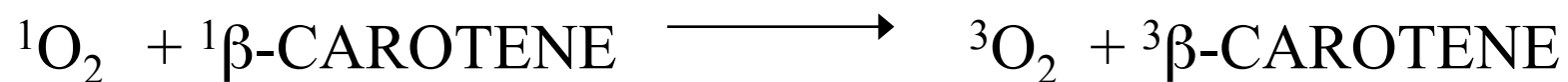


LYCOPENE



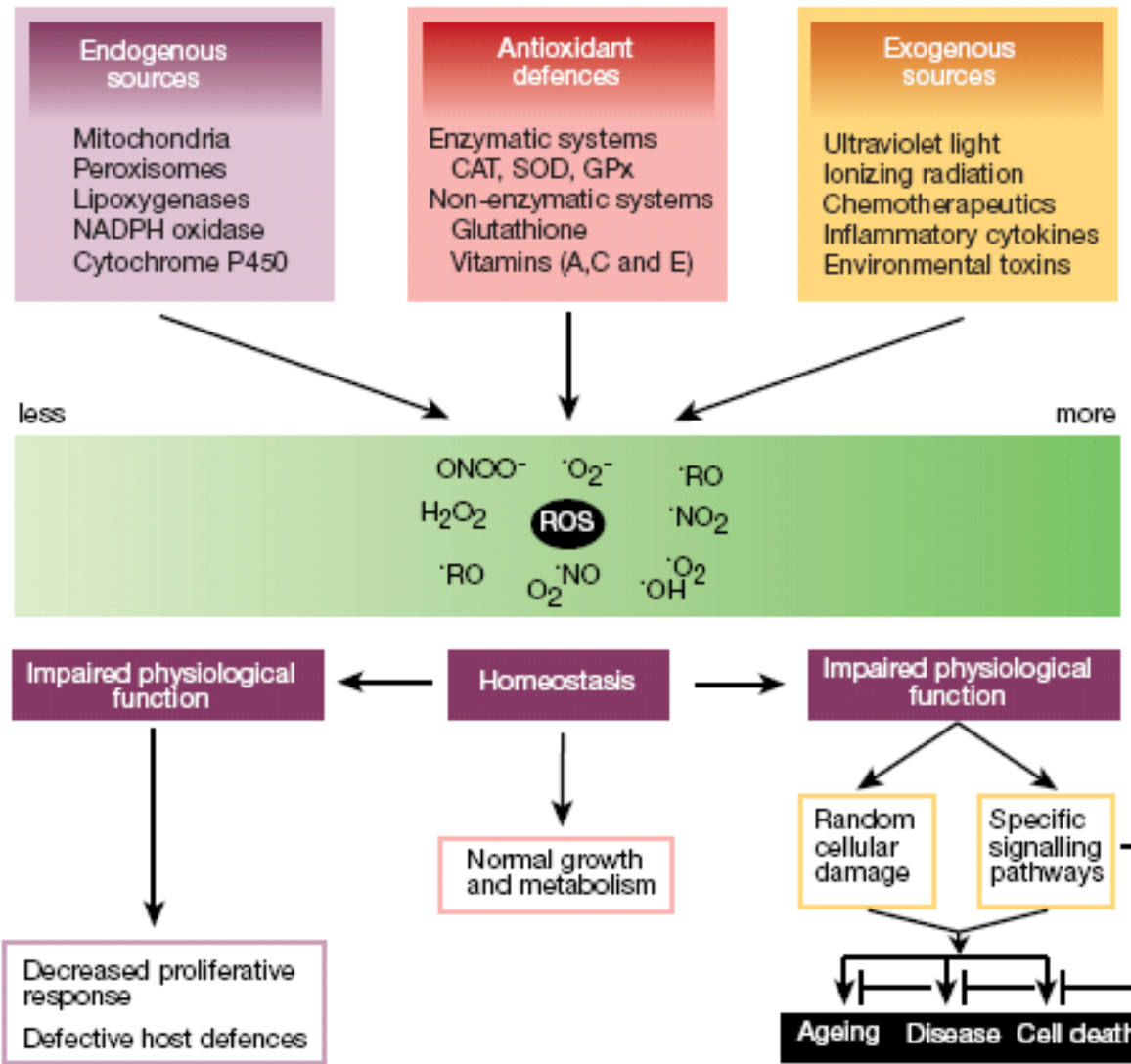
ZEAXANTHIN

Mécanisme antioxydant des caroténoïdes: cas de l'oxygène singulet



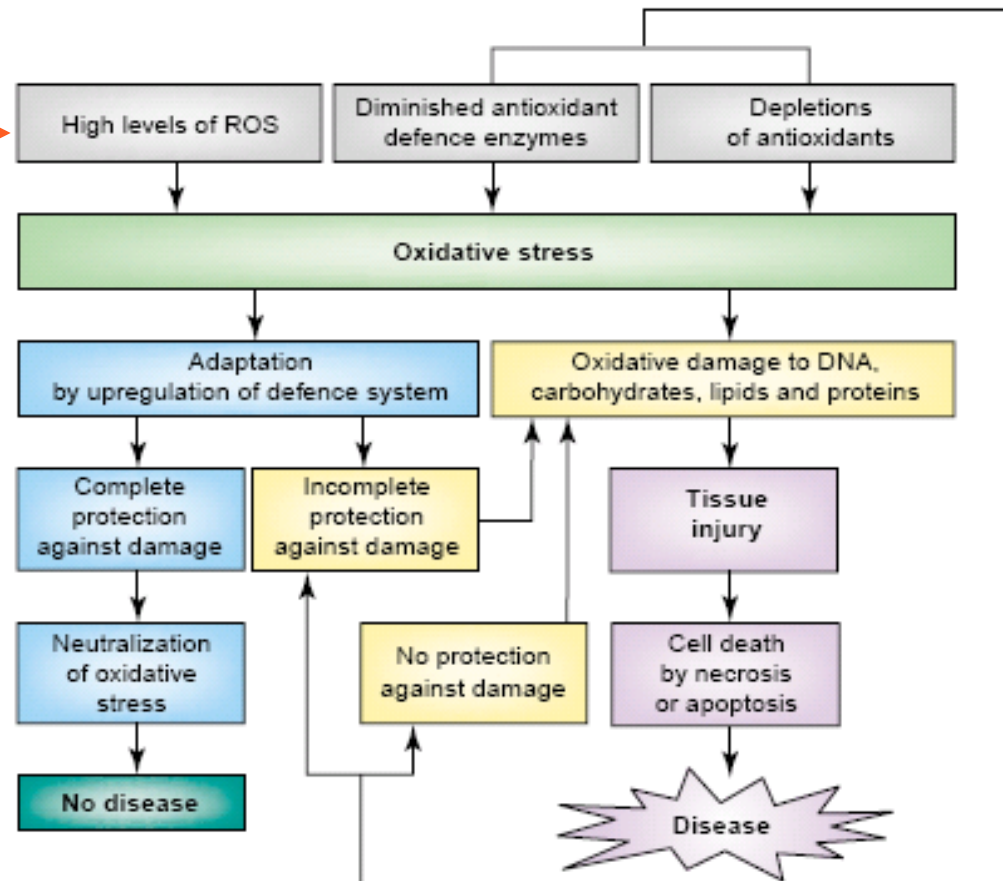
Conversion non-radiative

Vue globale du stress oxydant



Stress oxydant et pathologie humaine

Inflammation →



Della-Donne | Trends in Molecular Medicine (2003); 9:169-176

La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Dégénérescence des neurones moteurs médullaires; âge >45 ans

SLA familiale (<10% des cas)

Incidence 1-2/100.000 hab. (sauf Guam, péninsule de Kii, athlètes)

Indices clairs de stress oxydant cellulaire dans les neurones

15% des SLAF : mutation « gain de fonction » non-dismutase de la Cu,Zn SOD₁?



Maladies avec présence de marqueurs de stress oxydant (liste abrégée)

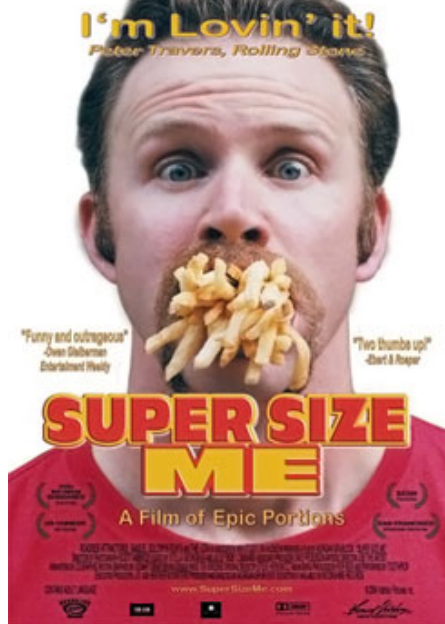
- Sickle cell disease
- ALS
- Systemic lupus erythematosus
- Asthma
- Systemic sclerosis (scleroderma)
- Atherosclerosis
- Diabetes mellitus
- Preeclampsia
- ARDS
- Alcoholic liver disease
- COPD
- Asbestosis
- HIV-positive patients
- Acute and chronic alcoholic liver disease
- Retinopathy of prematurity
- Rheumatoid arthritis
- Myocardial inflammation
- Osteoarthritis
- Preeclampsia
- Chronic kidney disease
- Friedreich ataxia
- Crohn disease
- Renal cell carcinoma
- Cystic fibrosis
- Spherocytosis
- Huntington disease
- AD
- Hyperhomocysteinemia
- Ischemia/Reperfusion injury
- Interstitial lung disease
- Pancreatitis
- Primary biliary cirrhosis
- Psoriatic arthritis
- Lung cancer
- Pulmonary hypertension
- Lung injury
- Multiple sclerosis
- **Inflammation...**

Effet antioxydant des ...statines

- Arch Toxicol. 2008 Dec;82(12):885-92. **Antioxidative effects of statins.**
- [Adam O](#), [Laufs U](#).
- HMG CoA reductase inhibitors (statins) have been shown to be effective lipid lowering agents and are beneficial in the primary and secondary prevention of coronary heart disease. However, the overall benefits observed with statins appear to be greater than what might be expected from changes in lipid levels alone and the positive effects have only partially been reproduced with other lipid lowering drugs, suggesting effects in addition to cholesterol lowering. In experimental models, many of the cholesterol-independent effects of statins are mediated by inhibition of isoprenoids, which serve as lipid attachments for intracellular signalling molecules such as small Rho guanosine triphosphate-binding proteins, whose membrane localization and function are dependent on isoprenylation. This review summarizes the **effects of statins on endothelial function and oxidative stress.**

L'alimentation et le mode de vie influencent fortement le stress oxydant

Une alimentation déséquilibrée



La sédentarité/effort violent



Le tabac



...sont les problèmes les plus courants

L'alimentation industrielle

Quantité?

Quantité?

Qualité?

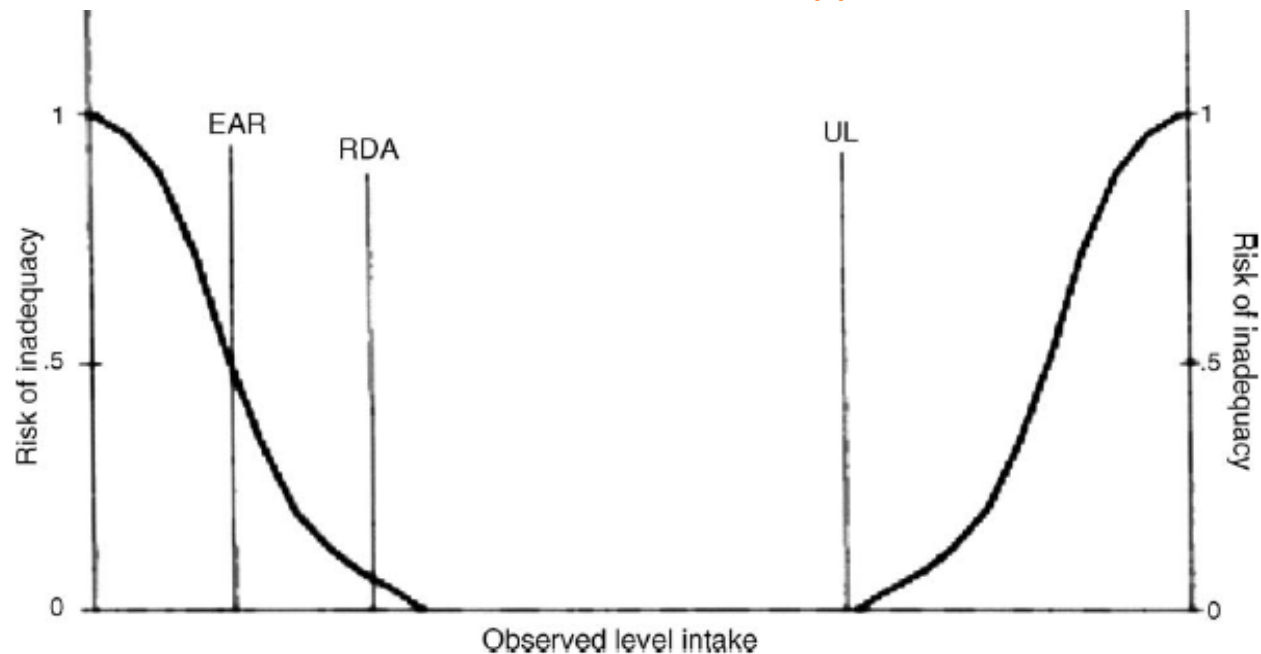
Effet dose-réponse des nutriments

Cas général

estimated average requirement

recommended dietary allowance

upper intake level

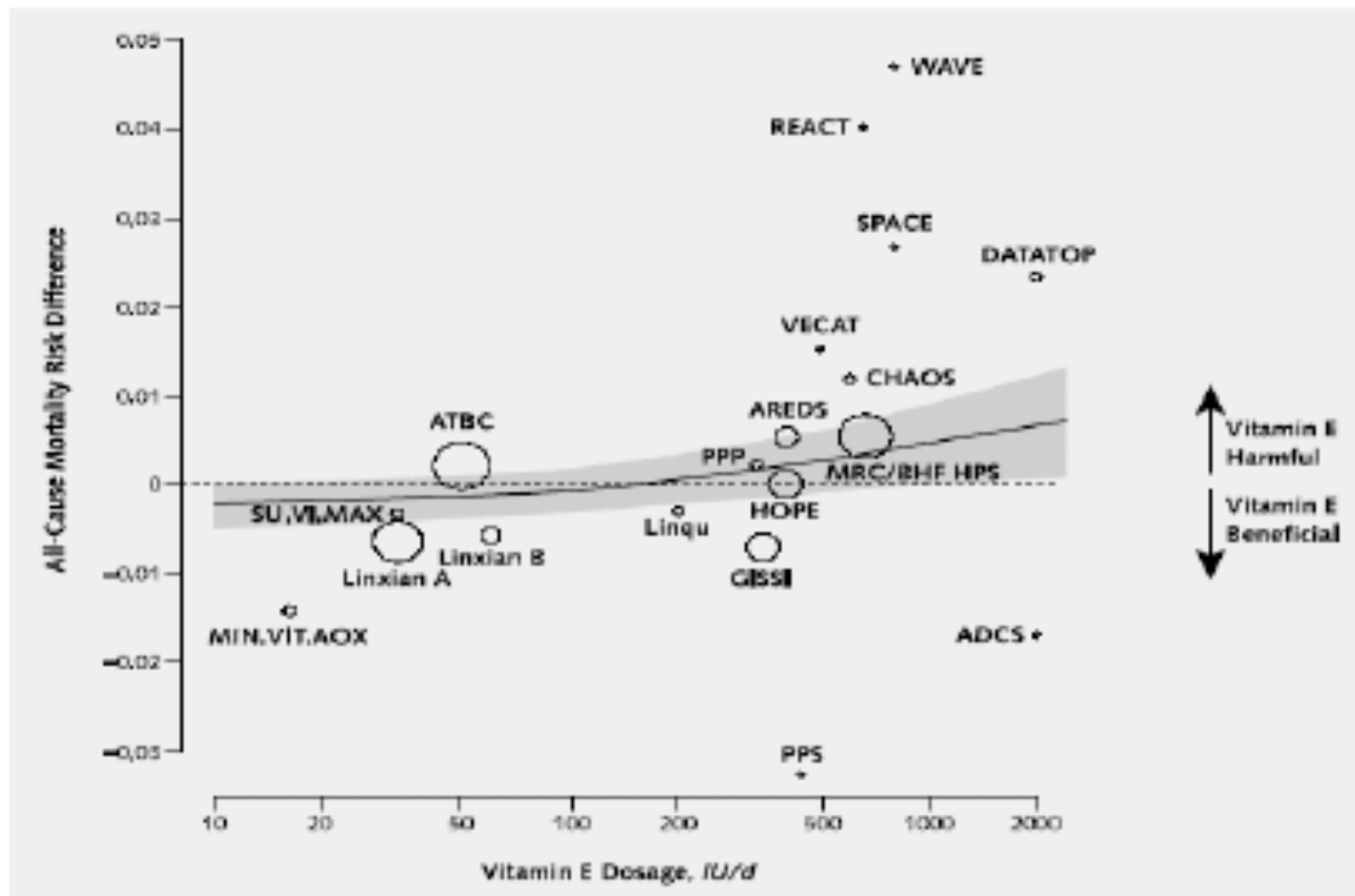


DRI: dietary reference intake

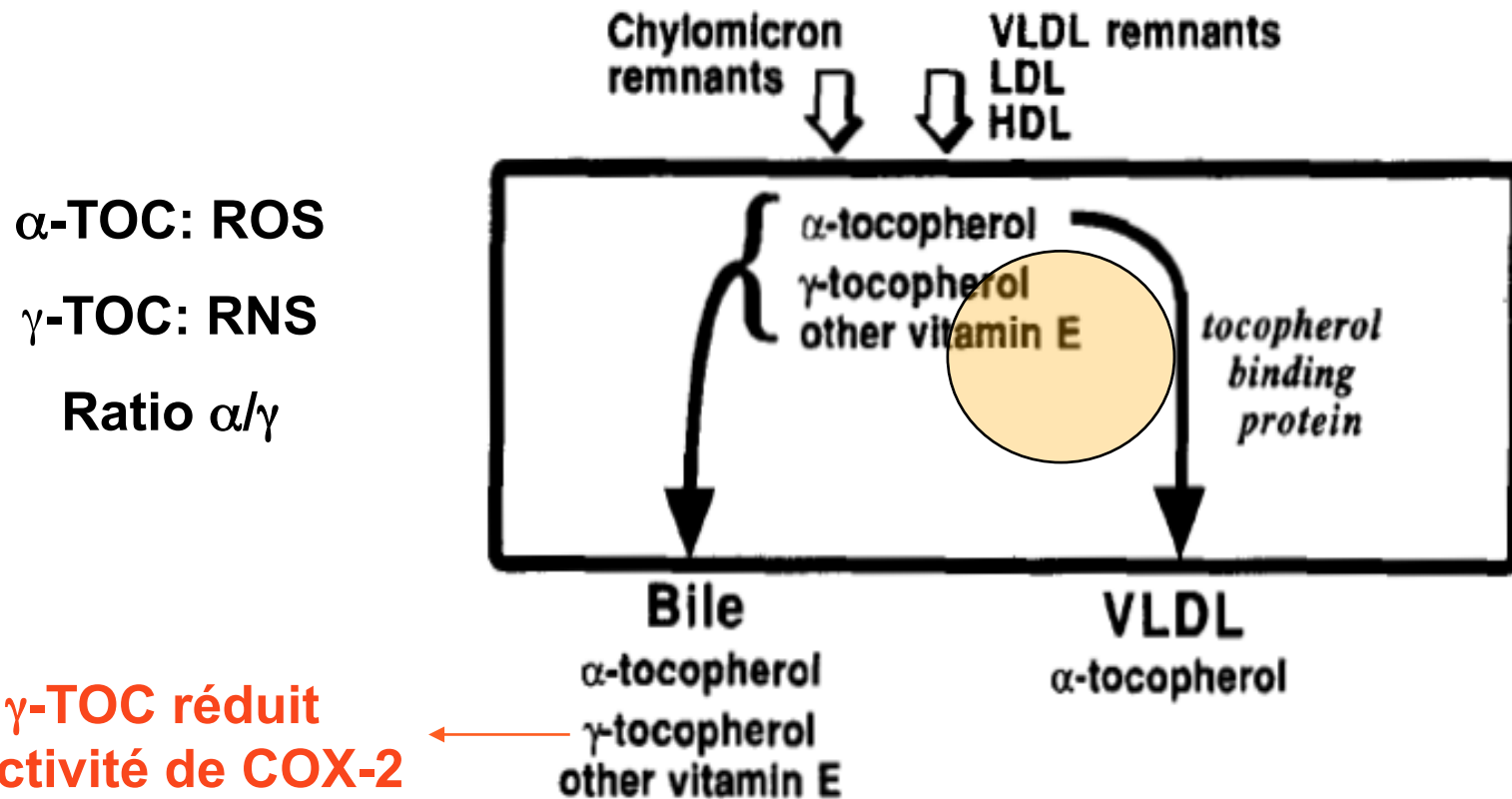
Whiting SJ, Calvo MS, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 97 (2005) 7–12

Alpha-tocophérol

Meta-Analysis of Vitamin E Safety



Vitamine E: l'excès peut nuire...

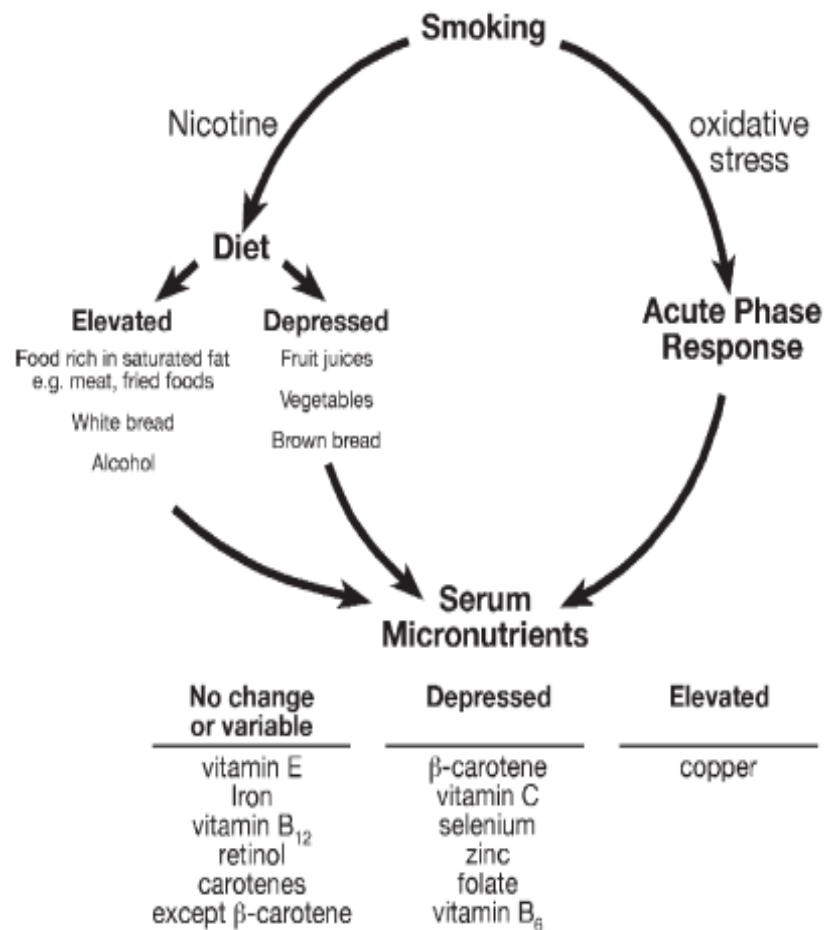


Attention à la fortification

Inag Q et al Am J Clin Nutr 2001;74:714-22.

Kayden HJ and Traber MG J Lipid Research 1993; 34:343-358

Interaction entre tabagisme et micronutrition



Les fumeurs ont moins de risque de développer un cancer du poumon si ils maintiennent un taux de B-carotène sérique total assez élevé.

→ ↑ cancer

Northrop-Clewes C. A. , Thurnham D.I. Clinica Chimica Acta 377 (2007) 14–38
 Ames BN, Mutation Research 475 (2001) 7–20

Etudes ATBC, CARET, Physician's Health

- **ATBC**: α -tocophérol 50 mg et/ou β -carotène 20 mg; durée 5-8 ans; 29133 hommes (50-69 ans); fumeurs/non-fumeurs; Finlande.
- **CARET**: β -carotène 30 mg et rétinyl palmitate 25.000 UI; 14254 fumeurs et ex-fumeurs (50-69 ans); 4060 hommes exposés à l'asbeste(45-69 ans). Arrêt prématuré de la médication.
- **Physician's Health**: 22071 médecins (hommes 40-84 ans); β -carotène 50 mg 1J/2; >12 ans.

- **Conclusion: Elévation modérée du risque de cancer du poumon chez les fumeurs traités par all-trans β -carotène, pour ATBC et CARET uniquement.**

ATBC Study Group New Eng J Med 1994, 330:1029-1035 Omenn GS et al J Natl Canc Inst, 1996, 88:1550-1559

Hennekens CH et al, New Eng J Med 1996, 334:1145-1149

Etudes ATBC, CARET, Physician's Health: la suite!

- CARET: 6 années après l'arrêt, risque= NS
- Le mécanisme reliant β -carotène à haute dose et cancer du poumon n'est pas certain mais:
 - Le β -carotène peut générer des métabolites oxydés.
 - Ces métabolites activent le CYP450
 - Il en résulte un catabolisme accru de l'acide rétinoïque
 - La dérégulation RAR/RXR désinhibe c-Fos et c-Jun
- Il faut progresser dans le domaine des sciences fondamentales avant de revenir vers des études cliniques.
- **Peut-on faire mieux?**

Etude Su.Vi.Max: prévention primaire micronutritionnelle du cancer

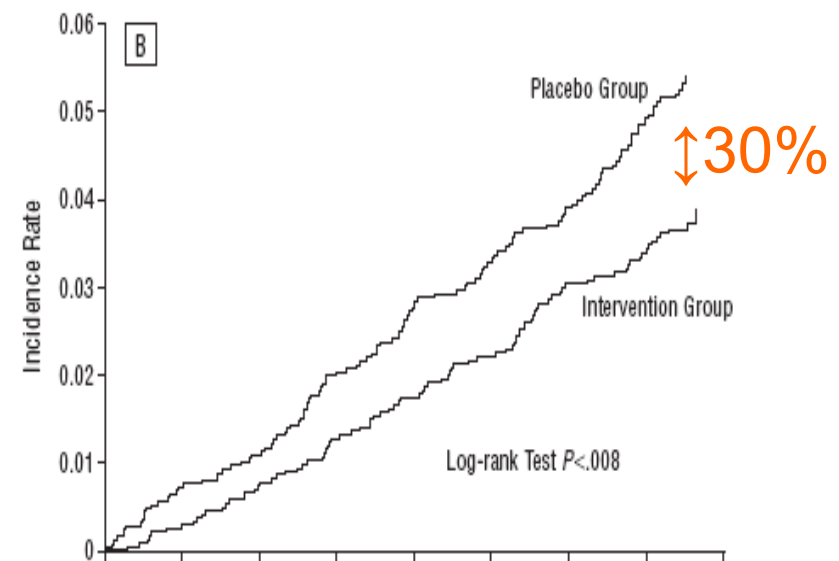
12741 participations complètes

Etude prospective randomisée en double insu, contrôlée

7.5 années de suivi

Zinc, Sélénium, Vit. E, Vit. C et B carotène **associés** à doses **nutritionnelles**.

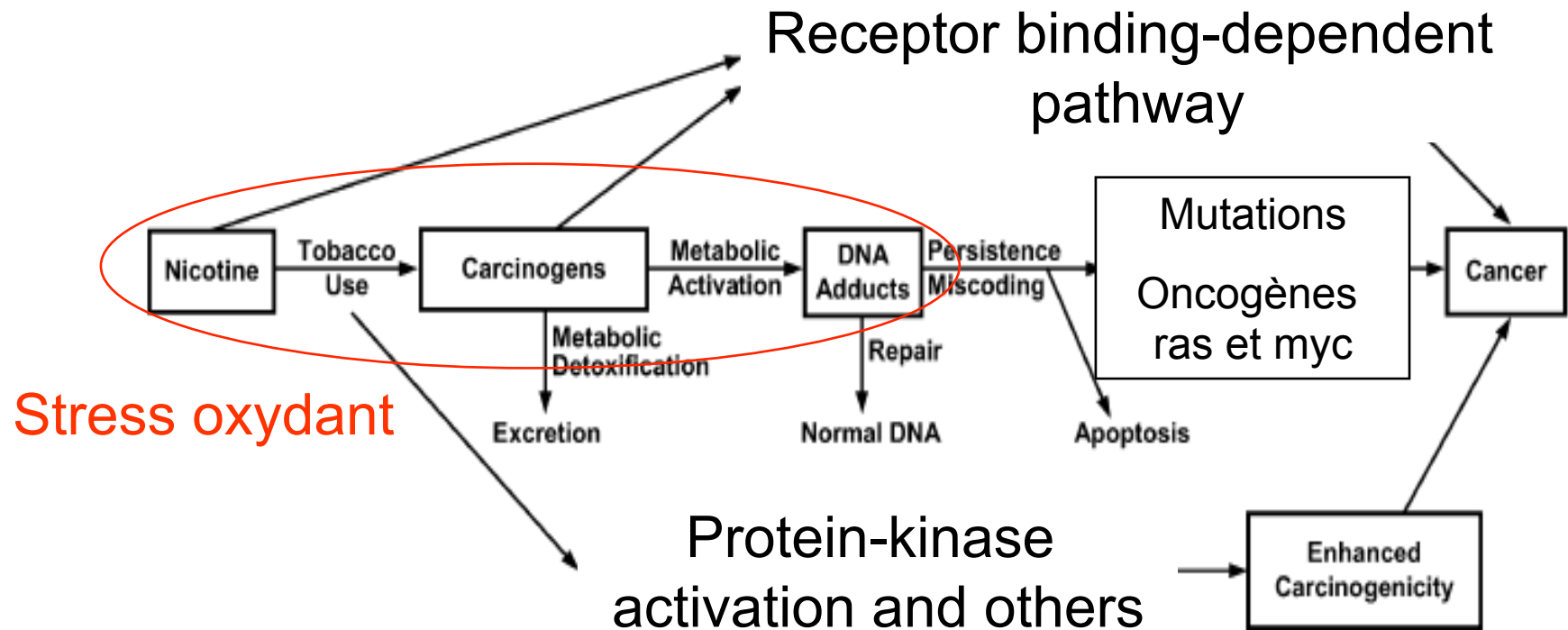
Incidence de cancers, hommes



Galan P et al British Journal of Nutrition 2005, 94, 125–132

Hercberg et al, Arch Int Med 2004, 164:2335

La carcinogenèse



Modifié d'après Wogan GN *et al* Seminars in Cancer Biology 14 (2004) 473–

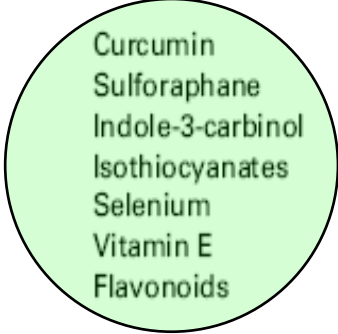
486

ERO, stress oxydant et carcinogenèse

- Il existe un niveau physiologique d'ERO
- Altérations des molécules
 - ADN (génotoxicité) Bases oxydées, site abasique, adduits
 - Protéines (épigénétique) Régulation génome, déchets
 - Lipides Propagation des réactions, adduits
- Altération des signaux
 - Intracellulaires
 - Intercellulaires Connexines
- Système de réparation de l'ADN

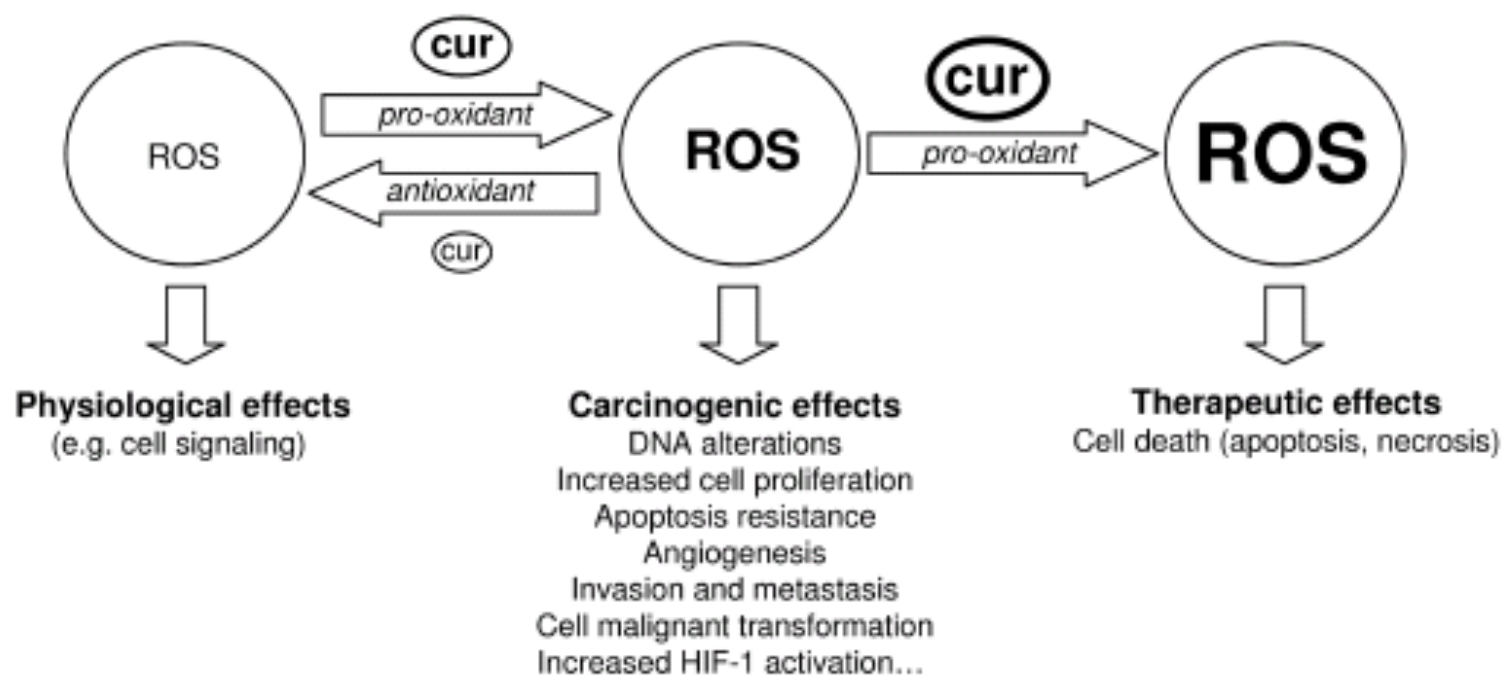
Initiation → Promotion → Progression

Chémoprévention du cancer: les pistes

Function	Examples	Source
Blocking agents Enhance detoxification of carcinogens Inhibit cytochrome P450-mediated activation of carcinogens Antioxidant activity (scavenge free radicals) 'Trap' carcinogens and prevent their interaction with DNA	 Curcumin Sulforaphane Indole-3-carbinol Isothiocyanates Selenium Vitamin E Flavonoids	Turmeric Cruciferous vegetables Cruciferous vegetables Cruciferous vegetables Nuts and meat Vegetable oils Fruits and vegetables
Suppressing agents Disrupt the cell cycle and/or induce apoptosis Modulate hormone activity Modulate nuclear receptors Suppress gene expression by DNA methylation	EGCG Quercetin Resveratrol Curcumin Sulforaphane Genistein Vitamin D Retinoids Folic acid	Green tea Onions and tomatoes Grapes Turmeric Cruciferous vegetables Soy beans Fish Eggs and milk Fruits and vegetables



Le curcumin: trouver la dose...



Fruits, légumes, épices

- L'activité antioxydante n'est pas le seul effet biologique
- Substances actives multiples
- Réduction du risque:
 - Cardiovasculaire
 - AVC
 - Cancer
 - Maladies chroniques: Parkinson, Alzheimer, diabète, ...
- Facteurs de variabilité:
 - Espèce et variété
 - Origine géographique
 - Année (météorologie)
 - Saison
 - Stockage et transport
 - Préparation culinaire

Ces facteurs rendent très complexe la compréhension des mécanismes

Activités antioxydantes (ORAC/100 g)

Oxygen Radical Absorbance Capacity

• Girofle	314446	• Airelle	9584
• Cannelle	267536	• Haricot rouge	8459
• Cumin	76800	• Myrtille	6552
• Chocolat noir	50000	• Artichaut	6551
• Curry	48504	• Mûre	5437
• Thym	27000	• Framboise	4882
• Moutarde	29527	• Amande	4454
• Gingembre	28811	• Citron	1125
• Poivre	27618	• Courgette	180

Les fruits et légumes sont-ils meilleurs que les pilules?

- 43 personnes réparties aléatoirement en trois groupes
- Alimentation contrôlée (Etude 6-a-day)
- « Fruveg », pilule, placebo
- Durée 25 J
- Endpoints: marqueurs du stress oxydant
- Résultats: écarts mineurs mais augmentation GPx significative pour Fruveg
- Conclusion: l'apport des fruits et légumes pourrait être supérieur à celui des suppléments.

Dragsted LO et al Am J Clin Nutr 79:1060

Profils antioxydants et couleurs

Rouge	Anthocyanines, lycopène	Betterave, cerise, chou rouge, fraise, tomate Oignon, poivron, pomme et radis rouges
Bleu-mauve	Polyphénols, flavonoïdes	Aubergine, cassis, framboise, mûre, prune, pruneau, raisin
Vert	Chlorophylle, voir ci-dessous	Avocat, brocoli, épinard, kiwi, chou de Bruxelles Haricot, poire et poivron verts
Jaune-orange	B-carotène, lutéine , zéaxanthine, quercétine	Abricot, ananas, carotte, citron, mangue, orange, papaye, pêche, poivron jaune
Blanc	Composés soufrés, sélénium Autres composés	Ail Pomme

L'analyse médicale pour évaluer le stress oxydant et corriger le mode de vie

L'analyse de laboratoire joue un rôle clé dans cette démarche :

- Les déséquilibres sont objectifs et quantifiables
- La démarche médicale se base sur des faits concrets qui favorisent la prise de conscience. L'approche est personnalisée.
- Les recommandations reposent sur des données individuelles au lieu de conseils généraux.
- Les effets de l'intervention sont contrôlables. Les résultats d'analyses objectivent les résultats et renforcent la motivation.

Applications des tests de laboratoire

- **Vérifier** si le statut en oligo-éléments et vitamines est adéquat.
- **Suivre** les effets d'une prescription (compliance, absorption, adéquation) ou d'un conseil alimentaire.
- **Évaluer** les défenses et réponses contre le stress oxydant
 - Dégâts LDL oxydées, bases oxydées
 - Réponses Glutathion peroxydase $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$
Superoxyde dismutase (Cu,Zn) $\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
 - Antioxydants Caroténoïdes, vitamine E et C, Zn, Se, GSH/GSSG
 - Pro-inflammatoire Profil des acides gras
- **Détecter** la prise inavouée ou par inadvertance de suppléments.
 - Alpha-tocophérol: \uparrow de l' α -tocophérol, \downarrow du γ -tocophérol, $\uparrow\uparrow$ du rapport α/γ .
 - Concentration de β -carotène; profil des caroténoïdes
 - Concentration ou excrétion d'oligoéléments (Zn, Se, ...)

Paramètres biologiques

Espèces réactives

$O_2^{\circ-}$

$^{\circ}OH$

ROO°

NO°

....

Très instable
Très complexe

Dégâts

8-iso-PGF 2α

4-HNE

MDA

8-OH 2-déoxy DG

ADMA

AGEP

....

Instable
Complexe

Défenses

Eléments traces

Enzymes

Antioxydants



GSH/GSSG

Vit C

Instable ou stable
Moins complexe

Notre bilan

STRESS OXYDANT ET DEFENSES OXYDANTES (cancer, vieillissement) - NUTRITION : carences et excès

Nutrition : vitamines et caroténoïdes

Antioxydants : lipophiles

ZVIT Vitamines et antioxydants

Sang natif - gel

- V-A Vitamine A
- V-E Vit E alpha tocophérol
- GV-E Vit E gamma tocophérol
- BCARO Béta-carotène
- ACAR Alpha-carotène *
- LYCO Lycopène *
- LUTZ Lutéine + zéaxanthine *
- BCRY Béta-Cryptoxanthine *
- CHO Cholestérol

Nutrition : éléments traces

Antioxydants : hydrophiles

ZENZ Eléments traces et enzymes

Sang natif - gel

EDTA

Spécial métaux + aiguille

- GPX Glutation peroxydase (GPX) *
- SODI Superoxyde dismutase (SOD) *
- HGB Hémoglobine
- CUS Cuivre
- ZNS Zinc
- SES Sélénium
- FET Ferritine
- URQ Urate

•Unilabs Biocheck

•Des valeurs de référence fonctionnelles

•Des graphiques

•Des commentaires

Antioxydants

Equilibre nutritionnel

Enzymes et cofacteurs

Conclusions

- Le stress oxydant est un concept complexe et en pleine évolution.
- Il s'agit d'un mécanisme et non d'une maladie.
- En pratique les mécanismes inflammatoires servent souvent d'évènement déclenchant.
- On peut mesurer sinon le stress du moins ses conséquences
- On peut mesurer les défenses
- Il est possible d'agir par voie pharmacologique et/ou nutritionnelle