



Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT^{1*,**}

Stress oxydant et vieillissement

RÉSUMÉ

Parmi les théories proposées pour expliquer le vieillissement, les théories stochastiques attribuent un rôle prépondérant aux espèces réactives de l'oxygène qui provoquent des attaques des cibles cellulaires, induisant des dommages oxydatifs moléculaires cumulatifs responsables du vieillissement. Ainsi, au cours du vieillissement, un stress oxydant apparaît, caractérisé par un déséquilibre entre la production de ces espèces et les capacités antioxydantes de l'organisme (enzymes antioxydantes et systèmes antioxydants non enzymatiques). Ce phénomène se traduit par l'accumulation de produits d'oxydation des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques) au niveau plasmatique et au niveau cellulaire, la détermination de ces produits permet la réalisation d'une évaluation du stress oxydant. Cet article constitue une introduction aux principaux aspects biologiques concernant le stress oxydant et le vieillissement.

MOTS-CLÉS

Vieillessement, stress oxydant, espèces réactives de l'oxygène, antioxydants

Oxidative stress and aging

SUMMARY

Among the aging theories, stochastic theories confer a key role to the reactive oxygen species leading to molecular cumulative oxidative damages to cell targets responsible for aging. Thus, an oxidative stress occurs during aging; this oxidative stress is defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species and the antioxidant defences (enzymatic and non enzymatic systems). This oxidative stress results in the accumulation of the oxidation products of biomolecules (lipids, proteins, nucleic acids) in cells and plasma, which allows the evaluation of this stress by determination of oxidized products. This article introduces the main biological aspects concerning oxidative stress and aging

KEYWORDS

Aging, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants

I - Introduction

En 1956, Harman propose la théorie radicalaire du vieillissement selon laquelle les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les organismes aérobies induiraient des dommages oxydatifs sur les biomolécules qui, en s'accumulant, seraient responsables du vieillissement (1). Schématiquement, les ERO peuvent être des radicaux libres, porteurs d'un électron célibataire et donc très réactifs (par exemple, radicaux superoxydes et surtout hydroxyles), ou des espèces oxydantes non radicalaires (peroxyde d'hydrogène, acide hypochloreux, peroxyde nitrite...) (2). L'organisme dispose, pour maintenir ces ERO à des concentrations relativement faibles, de systèmes de défense. Les molécules contrôlant ainsi la production des ERO sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent « toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou in-

hibe significativement l'oxydation de ce substrat » (3, 4) (figure 1, page suivante). Compte tenu de cette théorie, le vieillissement cellulaire peut être associé à une production accrue d'ERO, à une diminution des systèmes antioxydants et/ou à une efficacité diminuée des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés (5).

II - Production d'ERO, systèmes antioxydants et systèmes de réparation au cours du vieillissement

1. Production d'ERO au cours du vieillissement

Les mitochondries sont le siège d'une importante production physiologique d'ERO ; en effet, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale,

¹Laboratoire des Lipides - Pavillon Benjamin Delessert - GH Pitié-Salpêtrière - 83, boulevard de l'Hôpital - 75651 Paris cedex 13
Tél. : 01 42 17 78 03 - Fax : 01 42 17 78 74 - E-Mail : dominique.roussetot@psl.aphp.fr

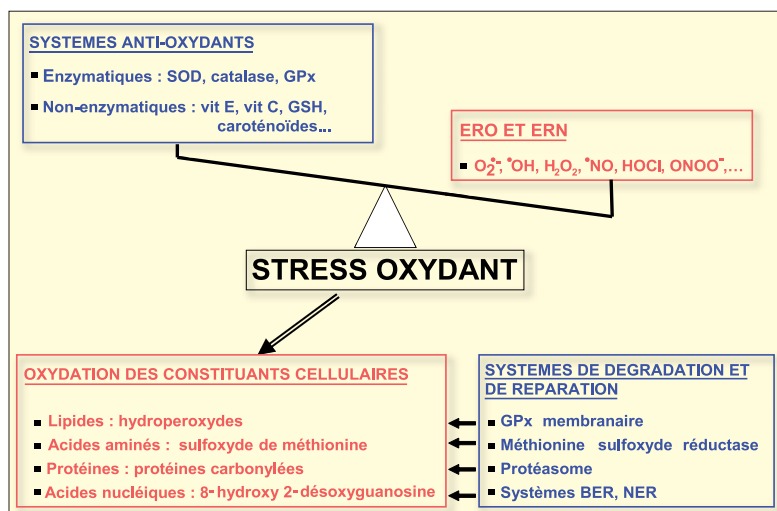
*Département de Biochimie, EA 3617 « Biochimie radicalaire et atteintes vasculaires », Faculté de Pharmacie, Paris 5

**Laboratoire des Lipides, GH Pitié-Salpêtrière (AP-HP), Paris

environ 2% de l'oxygène est transformé en radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Des expériences chez l'animal (rongeurs, mouche domestique) ont montré que cette production d'ERO augmente avec l'âge (6) et s'accompagne d'une moindre fonctionnalité des mitochondries, avec diminution de la production d'ATP. Cette production accrue d'ERO au niveau mitochondrial pourrait par ailleurs être à l'origine de mutations dans l'ADN mitochondrial, contribuant elles-mêmes au processus de vieillissement.

2. Systèmes antioxydants au cours du vieillissement

De nombreuses études ont été menées dans le but de mettre en évidence un éventuel déficit des systèmes enzymatiques antioxydants au cours du vieillissement, en particulier au niveau des érythrocytes puisqu'ils renferment notamment la Cu,Zn-superoxyde dismutase (Cu,Zn-SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion-S-transférase (GST). Toutefois, les résultats de ces études présentent des divergences (5). Une récente étude de Junqueira *et al.* menée chez 503 sujets sains (48% hommes, 52% femmes) montre cependant une augmentation significative de l'activité de la GPx chez les sujets de plus de 70 ans comparativement à toutes les autres tranches d'âge comprises entre 20 et 70 ans (7). En revanche, en ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques (vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, glutathion...) et les oligoéléments (sélénium, zinc), des carences ont pu être observées, en particulier en vitamine C dans des unités de long séjour (8), et en sélénium – cette dernière carence étant accompagnée d'une diminution de l'activité GPx – (9). L'étude de Junqueira *et al.* (7) montre en outre une diminution de la concentration de la vitamine E et du β -carotène circulants, deux antioxydants lipophiles, chez les sujets de plus de 70 ans, même lorsque ces concentrations sont ramenées à celle des lipides circulants (cholestérol-LDL). Une très récente étude menée par Ray *et al.* (10) chez 1002 femmes de 70 à 79 ans, incluses dans la « Women's Health and Aging Study » (WHAS) et suivies pendant 5 ans, a par ailleurs permis d'observer que les concentrations sériques les plus élevées en sélénium et caroténoïdes semblaient associées au plus faible risque de mortalité. Un autre moyen d'évaluation des capacités antioxydantes de l'organisme est d'apprécier le pouvoir antioxydant total plasmatique, qui mesure un ensemble de substances antioxydantes dans le plasma (protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine, glutathion réduit, vitamines antioxydantes,...). L'avantage est que certaines techniques de détermination de ce pouvoir antioxydant total ont été commercialisées sous forme de kits et sont donc d'utilisation aisée. Il faut cependant rester conscient que les substances contribuant à ce pouvoir antioxydant total sont à la fois des antioxydants bien caractérisés mais aussi des substances comme l'albumine, l'acide urique, la bilirubine, et même des substan-



ces non encore identifiées à ce jour (13, 14). Les résultats de ce type de test sont divergents selon les études chez les sujets âgés. Aejmelaeus *et al.* ont ainsi montré une augmentation du pouvoir antioxydant total du plasma (TRAP ou « total peroxy radical trapping antioxidant potential ») avec l'âge chez les femmes (11), mais ce résultat n'a pas été confirmé par d'autres auteurs (12). Enfin, au cours du vieillissement, on constate un déplacement de l'équilibre de la forme réduite vers la forme oxydée du glutathion, qui constitue le thiol majoritaire au niveau cellulaire ; ceci pourrait être impliqué dans le dysfonctionnement cellulaire observé avec l'âge (15). Une appréciation du capital oxydoréducteur de la cellule peut être obtenu par le dosage du glutathion réduit et oxydé grâce à des techniques de chromatographie liquide haute performance (CLHP) (16).

3. Oxydation des constituants cellulaires au cours du vieillissement

De nombreux composés oxydés s'accumulent au cours du vieillissement, l'un des plus connus est la lipofuschine, pigment brun fluorescent dont l'analyse révèle la présence de constituants lipidiques et protéiques difficilement dégradables (17). Les produits de glycation avancée (AGE pour « advanced glycation endproducts ») tels que la pentosidine ou la carboxyméthyllysine sont également retrouvés liés à des protéines à longue durée de vie telles que le collagène, la laminine, les protéines du cristallin ; des réactions d'oxydation interviennent dans la formation des AGE, c'est pourquoi l'on parle de glyco-oxydation ; la liaison des AGE à leurs récepteurs (RAGE) conduit à l'activation de MAP kinases et de facteurs de transcription « redox sensibles » (tels que NFkB), stimulant en retour la production d'ERO (18). La concentration de ces AGE augmente avec l'âge en dehors de toute pathologie diabétique. De nombreux acides aminés (soufrés, aromatiques...) sont sensibles aux processus d'oxydation. Parmi les acides aminés soufrés, la méthionine est oxydée en sulfoxyde de méthionine dont la

Figure 1

Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités antioxydantes de l'organisme (enzymes antioxydantes et systèmes antioxydants non enzymatiques).
BER : « base excision repair » ;
ERN : espèces réactives de l'azote ;
ERO : espèces réactives de l'oxygène ;
GPx : glutathion peroxydase ;
GSH : glutathion réduit ;
NER : « nucleotide excision repair » ;
SOD : superoxyde dismutase ;
vit C : vitamine C ;
vit E : vitamine E.

concentration tissulaire augmente avec l'âge, en particulier au niveau du collagène (19). Heureusement, l'organisme dispose d'un moyen de régénérer la méthionine à partir de son produit d'oxydation : c'est le système méthionine sulfoxyde réductase (Msr) qui fait intervenir la thiorédoxine et nécessite du NADPH, H⁺ (20). Ce système a montré une efficacité diminuée avec l'âge chez l'animal, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la concentration du sulfoxyde de méthionine.

Les protéines carbonylées constituent le marqueur le plus utilisé pour mettre en évidence l'oxydation des protéines au cours du vieillissement ; elles s'accumulent notamment au niveau des fibroblastes, mais aussi d'autres types cellulaires, de façon exponentielle avec l'âge (21). Leur mise en évidence repose sur la réactivité des groupements carbonylés avec la dinitrophénylhydrazine (DNPH), conduisant à une dinitrophénylhydrazone. Des dosages ELISA ont été commercialisés, ce qui améliore la praticabilité de ces tests. Cette augmentation des protéines carbonylées serait due non seulement à une accumulation d'agressions radicalaires, mais aussi à une diminution d'activité du protéasome, système permettant la dégradation des protéines modifiées, en particulier oxydées (22).

Le dosage des produits d'oxydation de l'ADN nécessite quant à lui de grandes précautions au niveau de l'extraction et de l'hydrolyse de l'ADN, afin de ne pas avoir d'oxydation artéfactuelle au cours de ces étapes préliminaires (23). Les techniques les plus fiables de dosage des bases oxydées reposent sur la CLHP avec détection électrochimique. Toutefois, certains kits ELISA ont été commercialisés, en particulier pour le dosage de la 8-hydroxydésoxyguanosine (8OHdG). Celle-ci peut être dosée dans l'urine, où sa concentration diminue avec l'âge, et reflète alors à la fois l'oxydation de l'ADN et l'activité des enzymes de réparation (24).

Parmi les produits de peroxydation lipidique, les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS ou « thiobarbituric acid-reactive substances ») ont été le premier marqueur utilisé apportant un argument à la théorie radicalaire du vieillissement. Ainsi, Poubelle *et al.* observèrent une corrélation positive significative entre les TBARS plasmatiques et l'âge de sujets présumés sains (entre 19 et 90 ans) (25). Cette augmentation significative des TBARS plasmatiques avec l'âge a été observée par d'autres auteurs, en particulier Junquiera *et al.* (7) qui avaient étudié en parallèle les systèmes antioxydants de sujets âgés de 20 à plus de 70 ans. Depuis, ce marqueur a été soumis à de nombreuses critiques : le dosage des TBARS est en effet un dosage permettant une évaluation globale de la peroxydation lipidique, par un dosage non spécifique (dosage d'un ensemble de produits aldéhydriques) ; les conditions du dosage (condensation à chaud avec l'acide thiobarbiturique) peuvent occasionner une production arté-

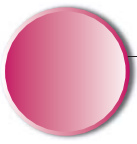
factuelle de TBARS ; certaines améliorations de la spécificité et la sensibilité peuvent cependant être apportées, comme la séparation par CLHP et la détection fluorimétrique (26). Malgré ces critiques, la relativement bonne faisabilité du dosage peut éventuellement être un argument pour son utilisation lors d'un suivi longitudinal de sujets. Un marqueur beaucoup plus récent de la peroxydation des lipides est représenté par les isoprostanes, dont la structure est très proche de celle des prostaglandines ; ils résultent de l'attaque radicalaire de l'acide arachidonique et constituent des marqueurs terminaux stables de la peroxydation des lipides. Ils se forment au sein des membranes et des lipoprotéines et en sont libérés par une phospholipase, puis sont éliminés dans l'urine où il est donc possible de les doser. Il a ainsi été observé une relation hautement significative entre l'excrétion urinaire d'un isoprostane, le 8-isoPGF₂α, et l'âge chez des sujets entre 10 et 80 ans ($r=0,81$; $p<0,001$) (27), bien qu'une autre étude n'ait pas permis de retrouver des résultats comparables (12). Le dosage au niveau plasmatique requiert des étapes assez lourdes de purification avant de pratiquer le test ELISA commercialisé ; le dosage dans l'urine est une alternative plus simple puisqu'il est alors possible de s'affranchir de ces étapes préliminaires.

III - Intérêt de la détermination du stress oxydant chez le sujet âgé

La question peut être posée de l'intérêt d'évaluer l'état de stress oxydant chez le sujet âgé et par quels moyens. Nous avons vu que le stress oxydant résulte d'un excès de production d'ERO et/ou d'un déficit de substances antioxydantes. Il est particulièrement important de pouvoir dépister certaines de ces déficiences, en particulier en vitamine C et en sélénium, et ceci requiert alors des techniques de dosage spécifiques. En revanche, une première approche peut être apportée par l'utilisation de méthodes plus globales et d'utilisation aisée, telles que l'évaluation du pouvoir antioxydant total. Une fois la déficience en un ou plusieurs antioxydants dépistée, une supplémentation peut être envisagée, en sachant qu'il faut toujours maintenir au maximum un équilibre entre les différents constituants de la défense antioxydante, puisqu'ils agissent de façon concertée (l'exemple classique est celui de la vitamine E, régénérée par la vitamine C). Le suivi de l'état de stress oxydant va alors trouver un autre intérêt, celui du suivi de la supplémentation. En pratique, étant donné la multitude de facteurs entrant en jeu dans le bilan du stress oxydant, il faudra pouvoir apprécier également le versant « oxydé », c'est-à-dire doser certains produits d'oxydation. En ce qui concerne la peroxydation lipidique, le dosage des TBARS, non spécifique, ne permet qu'une appréciation globale et ne peut être considéré que pour un suivi longitudinal des pa-

NOTE

Cet article constitue l'adaptation d'une présentation donnée dans le cadre de la session « Etat nutritionnel et vieillissement » de l'édition 2006 du Congrès Eurobiologie (Le sujet âgé... Une autre biologie, 16-17 mars 2006, Nancy) organisé par l'association des internes et anciens internes en pharmacie des Hôpitaux de Nancy.



tients, chaque sujet étant ainsi son propre témoin. De nouveaux marqueurs plus spécifiques peuvent trouver leur intérêt : c'est le cas des isoprostanes, pour lesquels la commercialisation de kits de dosage facilite la détermination en pratique courante, surtout si l'on fait appel au dosage urinaire qui ne requiert pas d'étapes de purification préalables.

La détermination du stress oxydant chez le sujet âgé peut alors être considérée comme un complément d'analyses biologiques permettant la surveillance de l'état des défenses antioxydantes participant au maintien d'un niveau contrôlé de stress oxydant.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 1956, 11, 298-300.
- (2) GARDÈS-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D. Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'Actualité Chimique*, 2003, 11-12, 91-96.
- (3) HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 1999, 3rd Edition, Oxford University Press, 936p.
- (4) THÉRON P., BONNEFONT-ROUSSELOT D. Systèmes antioxydants endogènes. In : Radicaux libres et stress oxydants. *Aspects biologiques et pathologiques* (DELATTRE J., BEAUDEUX J.-L., BONNEFONT-ROUSSELOT D., Eds), 2005, chap. 4, 87-111.
- (5) DELATTRE J., THÉRON P., BONNEFONT-ROUSSELOT D. Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Radicaux libres et stress oxydants. *Aspects biologiques et pathologiques* (DELATTRE J., BEAUDEUX J.-L., BONNEFONT-ROUSSELOT D., Eds), 2005, chap. 10, 281-309.
- (6) LASS A., SOHAL B.H., WEINDRUCH R., FORSTER M.J., SOHAL R.S. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biol. Med.*, 1998, 25, 1089-1097.
- (7) JUNQUEIRA V.B.C., BARROS S.B.M., CHAN S.S., RODRIGUES L., GIAVAROTTI L., ABUD R.L., DEUCHER G.P. Aging and oxidative stress. *Mol. Aspects Med.*, 2004, 25, 5-16.
- (8) SCHMUCK A., ROUSSEL A.M., ARNAUD J., FAVIER A., FRANCO A. Analyzed dietary intakes, plasma concentrations of zinc, copper, and selenium, and related antioxidant enzyme activities in hospitalized elderly women. *J. Am. Coll. Nutr.*, 1996, 15, 462-468.
- (9) DUCROS V., FERRY M., FAURE P., BELIN N., RENVERSEZ J.C., RUFFIEUX D., FAVIER A. Distribution of selenium in plasma of French women relative to age and selenium status. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 732-733.
- (10) RAY A.L., SEMBA R.D., WALSTON J., FERRUCCI L., CAPPOLA A.R., RICKS M.O., XUE Q.-L., FRIED L. Low serum selenium and total carotenoids predict mortality among older women living in the community: the women's health and aging studies. *J. Nutr.*, 2006, 136, 172-176.
- (11) AEJMEAEUS R.T., HOLM P., KAUKINEN U., METSA-KETELA T.J., LAIPPALA P., HERVONEN A.L., ALHO H.E. Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radical Biol. Med.*, 1997, 23, 69-75.
- (12) FEILLET-COUDRAY C., TOURTAUCHAUX R., NICULESCU M., ROCK E., TAUVÉRON I., ALEXANDRE-GOUABAU M.C., RAYSSIGUIER Y., JALENQUES I., MAZYP A. Plasma levels of 8-epiPGF2- α , an in vivo marker of oxidative stress, are not affected by aging or Alzheimer's disease. *Free Radical Biol. Med.*, 1999, 27, 463-469.
- (13) BONNEFONT-ROUSSELOT D., THEROND P., BEAUDEUX J.-L., PEYNET J., LEGRAND A., DELATTRE J. Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann. Biol. Clin.*, 2001, 59, 453-459.
- (14) ALHO H., LEINONEN J.S., ERHOLA M., LÖNNROT K., AEJMEAEUS R. Assay of antioxidant capacity of human plasma and CSF in aging and disease. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 1998, 12, 159-165.
- (15) DROGE W. Aging related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp. Gerontol.*, 2002, 37, 1333-1345.
- (16) BENRAHMOUNE M., THEROND P., ABEDINZADEH Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, 29, 775-782.
- (17) BRUNK U.T., TERMAN A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biol. Med.*, 2002, 33, 611-619.
- (18) BONNEFONT-ROUSSELOT D. Produits de glycation avancée. Production et signification physiopathologique. *Cah. Nutr. Diét.*, 2003, 38, 122-129.
- (19) WELLS-KNECHT M.C., LYONS T.J., McCANCE D.R., THORPE S.R., BAYNES J.W. Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 839-846.
- (20) HOSHI T., HEINEMANN S. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol.* 2001; 53 : 1-11.
- (21) MOSKOVITZ J., YIM M.B., CHOCK P.B. Free radicals and disease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, 397, 354-359.
- (22) PETROPOULOS I., CONCONI M., WANG X., HOENEL B., BREGEGERE F., MILNER Y., FRIGUET B. Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2000, 55, B220-B227.
- (23) CADET J., DOUKI T., GASPARUTTO D., RAVANAT J.-L. Réactions d'oxydation et cibles biologiques : acides nucléiques. In : Radicaux libres et stress oxydants. *Aspects biologiques et pathologiques* (DELATTRE J., BEAUDEUX J.-L., BONNEFONT-ROUSSELOT D., Eds), 2005, chap. 7, 169-243.
- (24) FRAGA C.G., SHIGENAGA M.K., PARK J.W., DEGAN P., AMES B.N. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 4533-4537.
- (25) POUBELLE P., CHAINTREUIL J., BENSADOUN J., BLOTMAN F., SIMON L., CRASTES DE PAULET A. Plasma lipoperoxides and aging. Critical assessment of the thiobarbituric acid method for the measurement of lipoperoxides and malondialdehyde. *Biomed. Pharmacother.*, 1982, 36, 164-166.
- (26) DEL RIO D., STEWART A.J., PELLEGRINI N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2005, 15, 316-328.
- (27) WANG Z., CIABATTONI G., CREMINON C., LAWSON J., FITZGERALD G.A., PATRONO C., MACLOUF J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 α excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1995, 275, 94-100.