

# VALIDATION SCIENTIFIQUE DE LA SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX

## ENGAGEMENT D'ASEA À LA RECHERCHE

Depuis sa création, ASEA a alloué en priorité ses ressources pour la recherche sur l'efficacité de ses produits. Pour nous, il est important de confirmer que ces produits font une différence dans la vie de ceux qui les utilisent. ASEA continuera à créer des produits scientifiquement validés, ce qui rend primordiale la recherche continue. ASEA est engagé dans un processus continu de démonstration de l'efficacité et de la sécurité de leurs produits. Nous obtenons les certifications lorsque cela est possible et confirmons les avantages de la supplémentation de signalisation de type redox.

## CERTIFICATION DE REDOX PAR BIOAGILYTIX LABS

BioAgilytix Labs est un laboratoire indépendant américain spécialisé en bioanalyse de grosses molécules pour des entreprises pharmaceutiques et biotechnologiques. Situé en Caroline du Nord BioAgilytix est leader mondial dans les services de laboratoire indépendants, qui développe, optimise et effectue les essais bioanalytiques et la validation tierce partie, soutenant ainsi la découverte pharmaceutique, et le développement et la fabrication préclinique et clinique. En tant que leader de la recherche indépendante (laboratoire CRO) se spécialisant en besoins de grosses molécules, BioAgilytix permet aux innovateurs scientifiques de développer et fournir des produits biologiques révolutionnaires grâce à leur expertise en analyse cellulaire, biomarkers, immunogénicité et pharmacocinétique.

L'équipe d'experts (tous du niveau du doctorat) de BioAgilytix valide l'existence des molécules de signalisation de redox dans les produits de redox d'ASEA. ASEA fournit régulièrement un échantillonnage de produit de la



supplémentation ASEA Redox pour maintenir la certification de BioAgilytix.

## RÉGULATION POSITIVE DES ANTIOXYDANTS

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité de l'organisme de contrer ou désintoxiquer leurs effets nocifs au niveau cellulaire. ASEA a mandaté Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) pour déterminer si l'exposition à la supplémentation ASEA Redox active le noyau cellulaire afin de générer une augmentation de la production d'antioxydants, tels que la glutathion peroxydase (GPx).

### Protocole de l'étude

Les chercheurs ont exposé les cellules endothéliales humaines soit à la supplémentation ASEA Redox soit à une solution saline tamponnée aux phosphates (PBS) inerte. L'analyse standardisée 'western blot' a été utilisée pour déterminer si l'exposition à la supplémentation ASEA Redox active les noyaux des cellules pour augmenter la production des antioxydants tels que GPx, une enzyme essentielle dans les systèmes de défense d'antioxydants cellulaires. La concentration des messagers dans le noyau qui active l'augmentation des antioxydants a été également mesurée dans les cellules endothéliales humaines et comparée aux cellules non exposées à la supplémentation ASEA Redox.

Le mouvement des agents qui entrent dans le noyau peut se voir au microscope à l'aide de certains colorants et offre une façon de voir une incitation à l'augmentation des antioxydants.

Étant donné que la production des antioxydants peut également augmenter par le biais de l'exposition des cellules à de faibles niveaux de toxines inflammatoires, des essais ont été effectués pour s'assurer que la supplémentation ASEA Redox ne conduisait pas les cellules à subir cette réponse inflammatoire/toxique faible.

### Résumé des résultats

La vérification par l'analyse 'western blot' a clairement démontré une augmentation des antioxydants en réponse à une exposition à la supplémentation ASEA redox et ce en comparant à la réponse lors de l'utilisation de la solution saline de contrôle. Cet effet bien que temporaire sur une durée de 120mn environ était néanmoins clairement visible.

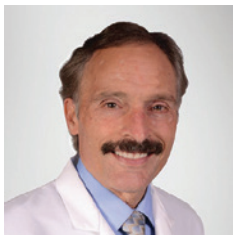
Les chercheurs indiquent que le résultat le plus impressionnant de cette évaluation est que l'exposition à la supplémentation ASEA Redox, à quelque concentration que ce soit, n'a pas initié de réponse inflammatoire mais plutôt une augmentation des antioxydants. Une stimulation de la production des antioxydants sans stimulation d'une inflammation faible est très rare.

## INFLUENCE DE L'INGESTION DE LA SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX SUR LE STRESS OXYDATIF

**Human Performance Laboratory**  
APPALACHIAN STATE UNIVERSITY

ASEA s'est associée au Laboratoire

de recherche sur la performance humaine du campus de la Caroline du Nord pour évaluer l'efficacité de la supplémentation ASEA Redox à aider les femmes adultes en surpoids/obèses à améliorer les facteurs de risque de maladies tels que la rigidité artérielle, le taux de cholestérol, et le stress oxydatif.



Caption translation

### Protocole de l'étude

Un total de 106 femmes en surpoids (de 20 à 73 ans) ont ingéré quatre onces liquides, (soit 120ml) de la supplémentation ASEA Redox ou d'un placebo (groupes randomisés) chaque jour pendant 12 semaines en double aveugle.

### Résumé des résultats

Le stress oxydatif est apparu comme le facteur de risque de maladie le plus influencé par l'ingestion de la supplémentation ASEA Redox pendant l'étude de 12 semaines.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées sont la forme oxydée du « mauvais cholestérol » et un contributeur principal à l'athérosclérose ou plaque qui se rétrécit les vaisseaux sanguins alimentant le muscle cardiaque. Les LDL oxydées ont diminué de 6,3% dans le groupe d'ASEA Redox par rapport au groupe de placebo qui a montré une augmentation de 0,9%, soit une différence significative. Après 12 semaines, le cholestérol sérique a également diminué de 6,3% dans le groupe d'ASEA Redox alors que le groupe de placebo n'a présenté qu'une réduction de 2,1%.

L'ingestion de la supplémentation ASEA Redox par rapport à (contre) celle du placebo par des femmes en bonne santé mais en surpoids/obèses, avec plusieurs facteurs de risque de maladie cardiaque, avaient des effets importants sur la réduction du cholestérol total et des LDL oxydées (un contributeur majeur à la formation d'athérosclérose).

Les niveaux post-étude des biomarqueurs de stress oxydatif cellulaire (et ceux d'autres facteurs de maladie) étaient plus bas dans le groupe d'ASEA Redox que dans le (par rapport) au groupe de placebo, soutenant l'influence significative à faire diminuer le stress oxydatif de l'ingestion quotidienne de la supplémentation ASEA Redox sur une période de 12 semaines (à faire diminuer le stress oxydatif).

## SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX - ÉTUDE IN VITRO DE LA SÉCURITÉ DU PRODUIT



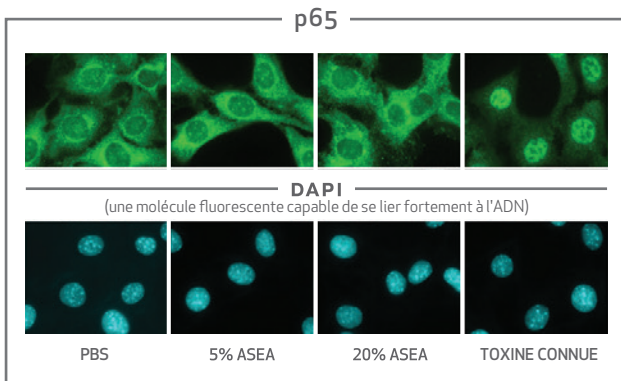
ASEA a engagé le laboratoire Pacific Northwest National Laboratory afin d'étudier la réponse à la toxicité des cellules eucaryotes quand elles se trouvent au contact de la supplémentation ASEA Redox.

Les cellules eucaryotes contiennent un ensemble de structures cellulaires qui jouent un rôle important dans l'équilibre énergétique, le métabolisme et l'expression génique. Ces cellules, lorsqu'elles sont stressées par une toxine, répondent en envoyant des facteurs de transcription (des protéines qui contrôlent si les gènes sont actifs ou inactifs) à l'intérieur du noyau. Une fois à l'intérieur, ces facteurs de transcription activent les gènes responsables de la défense et de la protection cellulaires contre les toxines. L'aménagement des chromosomes (appelé la translocation) des facteurs de transcription particuliers à l'intérieur du noyau peut se voir au microscope à fluorescence lorsque des colorants indicateurs spécifiques colorent les cellules.

Si la cellule subit une réaction (réponse) toxique, le colorant fluorescent est attiré (forcé) à l'intérieur du noyau avec le facteur de transcription. Dans cette expérience, deux facteurs de transcription, la sous-unité p65 de NF-kappaB et P-Jun ont été surveillées. Ces deux facteurs de transcription sont connus pour s'activer dans toutes les réactions toxiques.

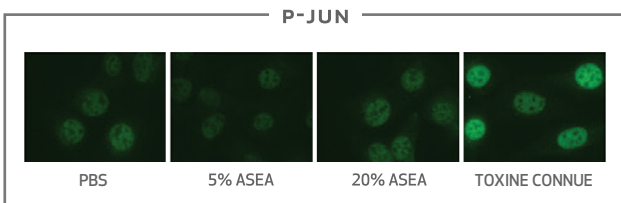
## Protocole de l'étude

Dans les photographies des images microscopiques fluorescentes des cellules, une réaction (réponse) toxique est enregistrée si le colorant vert entre dans le noyau.

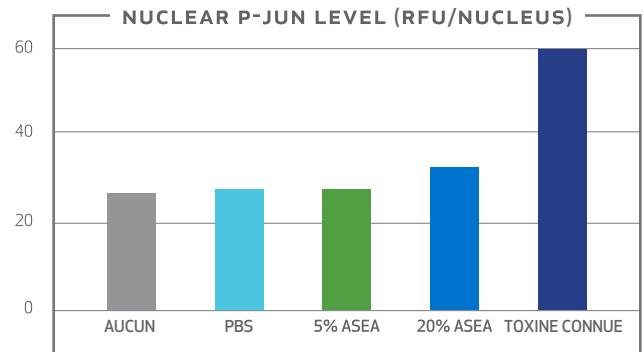


- Les cellules cibles ont été cultivées et exposées à :
1. la solution saline tamponnée aux phosphates (PBS) - le contrôle négatif ; aucune réponse toxique était attendue
  2. la supplémentation ASEA Redox à 5% - remplaçant 5% d'une solution de plasma sanguin par (avec) la supplémentation ASEA Redox
  3. la supplémentation ASEA Redox à 20% - remplaçant 20% d'une solution de plasma sanguin par (avec) la supplémentation ASEA Redox
  4. une toxine connue - le contrôle positif ; une réponse toxique était attendue

La réaction des facteurs de transcription (sous-unité



tp65 de NF-kappaB et P-Jun) a été photographiée sous microscope après l'exposition aux quatre solutions. Un colorant DAPI a été appliqué aux noyaux pour aider le logiciel à identifier le noyau cellulaire dans les images.



## Résumé des résultats

Les preuves visuelles de l'étude ont montré que l'exposition des cellules à des concentrations relativement élevées de supplémentation ASEA Redox n'enregistre pas de réponse toxique significative selon la translocation nucléaire. Sur la base de ces résultats, la supplémentation ASEA Redox, administrée par voie orale, ne provoque pas de réponse toxique ou d'inflammation aux (parmi le) tissus exposés.

## DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ ANTIOXYDANTE DE LA SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX

Les dommages oxydatifs ont été impliqués dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge, y compris les maladies cardiovasculaires, le cancer, les troubles neurodégénératifs et d'autres maladies chroniques. Si la production des radicaux libres dépasse les effets protecteurs des antioxydants et de certains cofacteurs, ceci peut provoquer des dommages oxydatifs.

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme essentielle dans les systèmes de défense d'antioxydants cellulaires, en désintoxiquant les peroxydes et les hydroperoxydes. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui aide à décomposer les molécules d'oxygène potentiellement nocives dans les cellules, ce qui pourrait prévenir les dégâts au tissu.

Dans cette étude, les scientifiques ont tenté de déterminer si le contact direct, de la supplémentation ASEA Redox avec les cellules, affecte l'efficacité antioxydante de la GPx et la SOD.

### Protocole de l'étude

Les cultures des cellules épidermiques standards ont été exposées à diverses petites concentrations de supplémentation ASEA Redox (moins de 1%) et à une solution saline tamponnée aux phosphates (PBS) pendant 24 heures. La diminution des oxydants, due à l'activité enzymatique de GPx, a été surveillée pendant une période de onze minutes après que l'agent chimique (l'hydroperoxyde de cumène) a déclenché la réaction. La réduction des oxydants est une indication de l'efficacité antioxydante. Trois répliquations du résidu oxydant dans les échantillons ont été lues toutes les deux minutes pour déterminer l'efficacité de la GPx à diverses concentrations de PBS et de supplémentation ASEA Redox.

### Résumé des résultats

Une augmentation de l'efficacité antioxydante de la GPx de 800% a été observée après 24 heures d'exposition à de faibles concentrations de supplémentation ASEA Redox. Une augmentation transitoire, pouvant aller jusqu'à 500%, a été observée dans l'efficacité antioxydante de la SOD entre 30 et 90 minutes après l'exposition à la supplémentation ASEA Redox d'une faible concentration (<1%).

L'exposition à la supplémentation ASEA Redox de concentration élevée, en comparaison, n'a suscité qu'une petite augmentation de l'efficacité antioxydante de la GPx, une augmentation qui ne dépendait pas de la concentration. Une augmentation de l'efficacité SOD n'a pas été observée ni pour la supplémentation ASEA Redox à forte concentration ni après de longues expositions (24 heures).

## EFFICACITÉ ANTIOXYDANTE DE LA SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX (FACILITATION ANTIOXYDANTE IN VITRO)

Les chercheurs du laboratoire Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) ont effectué des essais in vitro pour déterminer l'efficacité antioxydante des plus puissantes enzymes antioxydantes naturelles du corps - la glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD). Ils ont également examiné l'augmentation de la production naturelle de ces antioxydants à l'intérieur des cellules épithéliales et endothéliales.

### Protocole de l'étude

À l'aide d'un kit 'Assay Design® Stressgen®', les scientifiques ont mesuré l'activité antioxydante et la capacité des antioxydants à (pour) réduire l'activité oxydante. En outre, plusieurs expériences préliminaires ont été effectuées pour examiner la précision des résultats sur la base des normes connues de l'activité antioxydante.

### Résumé des résultats

Les résultats ont montré des effets significatifs et bien définis. Les extraits cellulaires, qui ont été exposés à la supplémentation ASEA Redox, ont montré huit (8) fois plus d'efficacité antioxydante pour la GPx que ceux exposés à la solution saline. L'efficacité antioxydante de la SOD était légèrement inférieure, avec environ cinq (5) fois plus d'efficacité. Cette efficacité a été évidente en particulier à de faibles concentrations de supplémentation ASEA Redox, testé jusqu'à 2,5% de la pleine puissance.

Ces tests in vitro ont démontré aux scientifiques une amélioration de l'efficacité antioxydante globale d'un minimum de 500% due à l'exposition à la supplémentation ASEA Redox.

## DÉTERMINATION DE LA TRANSLOCATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION D'ACTIVATION ANTIOXYDANTE

La translocation est un processus subcellulaire dans lequel les protéines activées sont transportées à l'intérieur du noyau cellulaire en tant que partie d'une voie de signalisation pour modifier le fonctionnement cellulaire en réponse à un événement ou à une condition de signalisation. Les facteurs de transcription sont des protéines impliquées dans le processus de conversion, ou de transcription de l'ADN en ARN. Le NRF2 est un type de facteur de transcription qui régule l'expression des protéines antioxydantes qui protègent contre les dégâts oxydatifs provoqués par les blessures et l'inflammation.

Dans cette étude, les scientifiques ont tenté de déterminer si la variation des concentrations de supplémentation ASEA Redox mise en contact avec des cellules vivantes active la translocation des facteurs de transcription NRF2 associés à une augmentation d'expression des antioxydants dans les cellules endothéliales humaines vivantes.

Une analyse 'western blot' supplémentaire a été effectuée pour vérifier l'apparence des facteurs de transcription

### Protocole de l'étude

Les cultures de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) ont été exposées à une forte concentration (5 - 20%) et à une faible concentration (1%) de supplémentation ASEA Redox et analysées de manière conjointe avec des cultures exposées à une solution saline tamponnée aux phosphates (PBS) en tant que contrôle négatif. Aux moments de 30, 60, 90 et 120 minutes, des échantillons cellulaires de chacune des cultures ont été placés sous un microscope fluorescent.

Un colorant fluorescent conçu pour marquer le facteur de transcription NRF2 ainsi qu'un marqueur nucléaire qui aide le logiciel à trouver les noyaux ont été appliqués aux cultures.

L'imagerie automatisée a été utilisée pour déterminer le degré d'accumulation nucléaire de NRF2 par spectroscopie de fluorescence de plusieurs cellules. Le NRF2 régule la transcription de quelques enzymes de défense antioxydante de phase II et soulève la possibilité que des enzymes de défense antioxydantes supplémentaires, telles que la glutathion transférase, peuvent être exprimées par le biais de l'exposition à la supplémentation ASEA Redox. L'accumulation de NRF2 dans le noyau, comme il se voit dans les images de microscopie, est un indicateur d'une expression antioxydante plus élevée dans les cellules.

### Résumé des résultats

Les résultats de l'examen suggèrent que la supplémentation ASEA Redox à une concentration plus basse induit une augmentation de 20-30% de la translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2 dans les cellules sur une courte période de 30 à 60 minutes.

Les chercheurs ont également observé que la supplémentation ASEA Redox a induit une diminution parallèle de la phosphorylation d'une protéine extranucléaire dont l'état de phosphorylation augmente en réponse au traitement au peroxyde d'hydrogène, cohérent avec un mode d'action antioxydant. Privées de sérum les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC) ont augmenté de façon significative le signal nucléaire NRF2 induit par la supplémentation ASEA Redox.

Directement et de façon spectaculaire, le NRF2 amplifie la faculté naturelle de produire la protection antioxydante en signalant l'ADN. Cette étude suggère que les molécules de la supplémentation ASEA Redox qui active le NRF2 peuvent déclencher la production de molécules antioxydantes, fournissant une protection contre les effets des radicaux libres par rapport à la supplémentation antioxydante standard.

## DÉTERMINATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA VIABILITÉ CELLULAIRES

Afin de déterminer la viabilité et la santé des cellules, les chercheurs ont évalué la supplémentation ASEA Redox sur la base du nombre de cellules de prolifération de cellules humaines et des marqueurs associés.

### Protocole de l'étude

Les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC), pendant 72 heures, ont été traitées avec la supplémentation ASEA Redox d'une concentration de 5- 20%. Un groupe témoin a été traité d'une solution saline tamponnée aux phosphates de 20%. Les chercheurs ont utilisé un compteur Coulter (un appareil qui détermine, en fonction de leurs dimensions, le nombre de particules en suspension dans un électrolyte) pour déterminer la numération des cellules. Les niveaux sériques de lactate déshydrogénase (LDH) ont mesuré la viabilité de la culture cellulaire à une concentration de supplémentation ASEA Redox de 0 à 20%. Des expériences similaires ont été réalisées pour les cellules épidermiques murines (JB6).

### Résumé des résultats

L'exposition à des concentrations élevées (un volume de 5-20%) de la supplémentation ASEA Redox a inhibé la prolifération cellulaire (déterminée à partir du nombre de cellules) non seulement pour les cellules de type HPMEC mais aussi pour celles de type JB6. L'inhibition des cellules HPMEC dépendait clairement de la concentration : Lorsque la concentration de supplémentation d'ASEA Redox a atteint un niveau de 20%, il a été observé une perte de numération cellulaire de 20%. Contrairement à la diminution de la prolifération, les niveaux sériques de LDH ont considérablement diminué lorsque la concentration de supplémentation ASEA Redox était à 5-20%, indiquant une augmentation de l'intégrité de la membrane cellulaire. Les résultats semblent suggérer que la prolifération cellulaire diminue tandis que la viabilité de la membrane augmente à des niveaux élevés.

## **ACTION DE LA SUPPLÉMENTATION ASEA REDOX SUR LES CELLULES STRESSÉES**

Dans cet examen, les scientifiques ont évalué les effets de la supplémentation ASEA Redox sur les cellules stressées par les cytokines (cachexine), la radiation ou la privation de sérum. Les cytokines sont des molécules de signalisation cellulaire qui facilitent la communication cellulaire dans les réponses immunitaires et stimulent le mouvement des cellules vers les sites d'inflammation, d'infection et de traumatisme.

### **Protocole de l'étude**

Les cultures cellulaires ayant des cycles cellulaires aléatoires normaux et les cultures qui approchent la confluence ont reçu des concentrations croissantes de cachexine (un groupe de protéines pouvant entraîner la mort cellulaire). Pendant 24 heures, ces cultures ont reçu soit un prétraitement d'une solution saline tamponnée aux phosphates de 10% ou celui d'une concentration d'ASEA Supplément Redox de 5-10%. Les chercheurs ont noté deux indicateurs de viabilité cellulaire : a) les niveaux sériques de LDH en tant qu'indication de l'intégrité de la membrane et b) le colorant rouge neutre en tant que démonstration de l'intégrité lysosomale.

Au fur et à mesure que les membranes cellulaires échouent, les LDH entrent dans le milieu sérique. Des quantités plus faibles de LDH indiquent une viabilité cellulaire plus élevée. L'intégrité des lysosomes (nécessaires pour la fonction cellulaire viable) est mesurée par l'absorption de l'indicateur coloré Rouge neutre. Des quantités plus élevées d'absorbance de Rouge neutre indiquent une viabilité cellulaire plus élevée.

### **Résumé des résultats**

La réponse des cellules, lorsqu'elles sont stressées par la cachexine, dépend de la phase cellulaire. Les cellules de cycle aléatoire normal ont présenté une diminution typique de la viabilité cellulaire accompagnée de la mort cellulaire. Les cellules borderline et celles de fin de cycle de vie confluentes étaient moins sensibles à l'assaut de cachexine, présentant des diminutions moins prononcées de viabilité cellulaire et moins de mort cellulaire.

L'exposition à la supplémentation ASEA Redox n'a provoqué aucun changement significatif dans la réaction des cellules de cycle aléatoire normal à la cachexine (montrant une perte de viabilité cellulaire et de mort cellulaire similaires). Cependant, les cultures approchant la confluence, exposées à la supplémentation ASEA Redox, ont montré une sensibilité élevée à la cachexine, restaurant un comportement comparable à celui des cellules normales. Les cellules borderline, présentant une réponse de cachexine relativement faible, et les cellules confluentes, normalement insensibles à l'assaut de la cachexine, ont montré une réponse beaucoup plus forte à la cachexine lorsqu'elles étaient exposées à la supplémentation ASEA Redox, les deux présentant une diminution de la viabilité et une augmentation de la mort cellulaire.

Il semble que l'exposition à la supplémentation ASEA Redox augmente le taux de mort des cellules confluentes, améliorant la réception naturelle de la cachexine dans les cellules en fin de cycle de vie. La supplémentation ASEA Redox n'est pas supposée provoquer de changements de la viabilité d'une cellule normale.

La cachexie est généralement sécrétée pour provoquer la mort cellulaire dans les tissus endommagés ou dysfonctionnels, permettant aux cellules saines de se diviser et (à) combler les vides. Ainsi, l'augmentation de la sensibilité à la cachexine dans les cellules dysfonctionnelles peut aider à accélérer un tel processus et n'est pas toujours considéré comme nocif.

Une accélération de la mort cellulaire dans les tissus stressés a été observée en fonction de la radiation et de la privation de sérum associées à l'exposition à la supplémentation ASEA Redox.