

## Activité antioxydante des sessions respiratoires du Bol d'Air Jacquier® sur des rats Wistar - Premières études

Béatrice MERCIER<sup>(1)</sup>, Josiane PROST<sup>(1)</sup>, Michel PROST<sup>(2)</sup>

(1) UPRES EA 4183 « Lipides et Signalisation Cellulaire »- Faculté des Sciences de la Vie, Dijon, France

(2) Lara-Spiral SA, Couternon, France

### Résumé

**Objectifs :** Le Bol d'Air Jacquier® est utilisé pour créer une molécule apte à délivrer du dioxygène au niveau cellulaire, dans le but de lutter contre l'hypoxie générée par un environnement pollué, le vieillissement, les maladies inflammatoires... Le but de la présente étude est de déterminer, dans un premier temps, si l'appareil engendre un stress oxydatif, et si, dans un deuxième temps, il possède un effet antiradicalaire. **Matériels et méthode :** Sur une période de 62 semaines, 10 rats mâles Wistar ont été répartis en deux groupes : un groupe Bol d'Air® (BA) a régulièrement respiré des terpènes peroxydés délivrés par l'appareil et un groupe témoin a respiré de la vapeur d'eau. Les sessions respiratoires duraient de 9 min, pour des fréquences allant de 1 à 12 par mois. Les taux de plusieurs composés antiradicalaires et le taux KRL ont été évalués dans le sang et dans les principaux organes.

**Résultats :** Au niveau de leurs organes, les deux groupes ne montrent pas de différence de concentrations pour la Cu,Zn SOD, le GPx, le GSH, le GSSG et les TBARS. L'appareil peut présenter un léger effet amincissant. Le groupe BA présente un taux de GR significativement supérieur au groupe témoin dans le plasma au cours de l'expérience, et dans les muscles à la fin de l'étude. Dans le groupe BA, le taux de la Cu, Zn-SOD plasmatique varie en fonction du nombre de sessions respiratoires hebdomadaires avant la prise de sang. Le groupe BA présente un taux KRL supérieur au groupe témoin à deux moments différents : au départ de l'étude (dosage dans le sang total des jeunes rats), et après une période où les rats bénéficiaient de 3 sessions respiratoires (dosage dans le sang total et les hématies des rats âgés). **Conclusion :** L'appareil ne génère pas de stress oxydatif, et semble produire un effet antiradicalaire global, dépendant du nombre de sessions respiratoires par semaine, tout particulièrement chez les rats âgés.

### Mots clefs :

Approches antiradicalaires globales et spécifiques, terpènes peroxydés.

### INTRODUCTION

Le stress oxydatif est induit par une large gamme de facteurs environnementaux, dont l'hypoxie. Par exemple, des cellules maintenues dans une atmosphère à faible concentration de dioxygène ont une durée de vie longue [1] tandis que celles placées dans une atmosphère à concentration élevée en dioxygène ont une durée de vie réduite [2]. Cependant, de nombreuses recherches récentes démontrent que l'hypoxie induit un stress considérable. Ce stress génère des réactions de survie permettant l'adaptation des cellules à leur

nouvel environnement *via* l'activation de messagers (comme l'*Hypoxia Inducible Factor*), stimulateurs de l'angiogenèse, de la glycolyse et de l'érythropoïèse [3]. Le but des recherches conduites par René Jacquier est de permettre une oxygénation équilibrée des individus (en bonne santé ou malades), quels que soient les niveaux de pollutions, physiques ou environnementales. En 1946, il conçoit le premier Bol d'Air Jacquier® [4]. Cet appareil génère des dérivés peroxydés de terpènes du pin *Pinus pinaster*. Les terpènes, issus de la résine de conifères à partir des isoprènes [5],

<sup>1</sup>Reçu le 13/07/2007 – Accepté : 9 octobre 2007.

Les recherches de Béatrice Mercier sont financées par le laboratoire Holiste (Le Port F-71110 Artaix)

Pour des tirés-à-part, s'adresser à B. Mercier, PhD, UPRES EA 4183 « Lipides et Signalisation Cellulaire », Faculté des Sciences de la Vie, 6, boulevard Gabriel, F-21000 Dijon (adresse courriel : beamerrier@laposte.net).

sont largement étudiés du fait de leurs activités bactéricides et fongicides [6, 7]. La forme peroxydée des terpènes semble leur ajouter une propriété : au cours de la peroxydation, les doubles liaisons des  $\alpha$  (alpha) et des  $\beta$  (bêta)-pinènes (principaux composés de la partie volatile des terpènes) s'ouvrent pour accepter un oxygène moléculaire. Ces nouveaux produits sont inhalés et passent à travers les parois alvéolaires jusqu'au sang où elles se fixent sur l'hémoglobine. Pour René Jacquier, l'oxygène est alors sous sa forme tétravalente. Le composé comprenant l'hémoglobine, les pinènes et l'oxygène, instable, est supposé délivrer l'oxygène aux cellules plus facilement que ne le fait l'hémoglobine (remarque : la tétravalence de l'oxygène est référencée par Grignard [8] et par Vincent *et al.* [9]).

Les effets nuisibles ou toxiques de l'oxygène sont liés à la formation et à la libération des dérivés actifs de l'oxygène (ROS – *Reactive Oxygen Species*), comme le superoxyde, le radical hydroxyle ou le peroxyde d'hydrogène. Depuis les années 1950, il est bien connu que ce phénomène oxydatif est à l'origine de nombreuses maladies (dont les pathologies du cerveau, du tissu nerveux et du système cardiovasculaire) mais aussi bien que dans le processus de vieillissement [11]. Les principaux composés cellulaires sensibles aux ROS sont les lipides (peroxydation d'acides gras polyinsaturés dans les membranes), les hydrates de carbone, les acides nucléiques et les protéines (par dénaturation ou par glycation). Les principaux mécanismes antiradicalaires utilisés par les cellules (superoxyde dismutase -SOD, catalase, le système

glutathion) régulent la formation de ces radicaux jusqu'à ce que la charge radicalaire déborde cette ligne de défense, ce qui lèse les cellules [12].

Le présent travail a pour but d'évaluer, si, dans un premier temps, le Bol d'Air Jacquier® génère un stress oxydatif et, dans un deuxième temps, s'il peut avoir un effet protecteur antiradicalaire. Pour cela, nous avons mesuré le niveau des TBARS et celui des principaux antiradicalaires, SOD et glutathion.

Toutefois, évaluer la capacité antiradicalaire totale d'un organisme en procédant à l'analyse complète de tous les antiradicalaires est impossible, en raison du grand nombre de molécules qui jouent -ou peuvent jouer- ce rôle. Il est également difficile d'appréhender avec exactitude toutes les réactions chimiques impliquées dans la défense cellulaire ainsi que les interactions entre ces réactions [13]. Ajoutons à cela qu'un antiradicalaire ne peut pas faire la différence entre les radicaux qui ont une fonction physiologique et ceux qui sont nocifs [14]. Enfin, une substance généralement acceptée comme antiradicalaire peut avoir une activité pro-oxydante dans certaines conditions [15] (par exemple, une augmentation significative de l'activité SOD est le signal d'une altération générale des processus oxydatifs caractéristiques de la démence, d'où l'hypothèse selon laquelle le taux de ces enzymes pourraient être utilisés comme éléments de diagnostic dans la maladie d'Alzheimer [16]). Pour sa part, Ciriolo *et al.* [17] a démontré que les niveaux de SOD différaient considérablement selon les différentes parties d'un même organe (cerveau). Ainsi, nous avons besoin d'un point de vue plus

global sur le statut antiradicalaire, intégrant la capacité des cellules à résister au stress oxydatif. Le test Spiral (Kirial SA Couternon, France) est en ce sens une bonne méthode, en permettant l'évaluation de la résistance à l'hémolyse du sang total (*Blood*) et des érythrocytes (*RBCs*), sous l'impact d'une attaque radicalaire standardisée [18-20]. En effet, nous savons que, lorsque les cellules sont soumises à un stress radicalaire, elles mobilisent toutes leurs capacités enzymatiques et moléculaires afin de résister à cette agression, jusqu'à leur lyse. Ainsi, au cours de cette phase d'attaque radicalaire, le temps de résistance cellulaire (taux KRL) est directement relié aux propriétés enzymatiques et moléculaires des cellules [18]. Plusieurs études ont démontré que plus le niveau KRL était élevé, meilleure était la capacité antiradicalaire de l'organisme [18, 21-23]. Cette méthode est également utilisée pour l'évaluation du statut antiradicalaire des organes [24, 25]. Dans notre étude, cette méthode a été utilisée au cours d'une expérience comparant des rats Wistar, respirant du Bol d'Air®, à un groupe de rats témoins, respirant de la vapeur d'eau.

## MATERIEL ET METHODE

### Animaux et régime alimentaire

Dix rats Wistar (Etablissement Dépre - F18230 Saint Douillard), âgés de 10 semaines au départ de l'expérience et pesant  $265 \text{ g} \pm 16.5$  sont répartis au hasard dans deux groupes de 5. Les rats sont gardés dans une animalerie aux conditions suivantes : alternance jour/nuit 12 h/12h, humidité 60 % et température moyenne de 24 °C. L'eau et la

nourriture sont fournis *ad libitum* (aliments secs standards de Lab-blocks - *Scientific Animal Food & Engineering* [SAFE] F-89290 AUGY), garantissant un apport correct en vitamines et sels minéraux, en conformité avec les recommandations de l'*American Institute of Nutrition Guidelines* [27]. Les rats sont pesés chaque semaine.

### TRAITEMENT

Un groupe de Wistar respirait régulièrement les terpènes peroxydés délivrés par le Bol d'Air® (groupe BA) et les autres respiraient de la vapeur d'eau délivrée par un appareil modifié (groupe témoin). L'expérience a été conduite sur une période de 62 semaines. Régulièrement, du sang a été collecté au bout de leurs queues dans des tubes capillaires hématocrites héparinisés (Hirschmann Laborgeräte, Allemagne), sous anesthésie locale (Crème EMLA, Astrazeneca Lab.). Au début de l'expérience, le sang a été prélevé à T0 et T15 minutes (après la première session de respiration de 15 minutes), et à T24 heures. Ensuite, les rats ont été soumis à des sessions respiratoires de 9 minutes, de 1 à 12 par mois, et leur sang collecté régulièrement à T3W (W = semaine), T5W, T12W, T17W, T21W, T26W, T31W et T45W, de 3 à 8 jours après la dernière session respiratoire.

Aucune inhalation n'a été prodiguée aux rats dans les 21 jours précédents la fin de l'expérience (T62W), et ils n'ont jamais été privés d'eau ou de nourriture. A T62W, les animaux ont été anesthésiés et tués avec de l'isoflurane (Aerrane, Baxter SA BP 56 78310 Maurepas Cedex, France), à raison de 0,1 mL/kg. Le sang a été collecté dans

des tubes de 10 mL contenant 500 µL d'EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétique) 2%, et les principaux organes prélevés et congelés à -20°C. Le plasma a été obtenu par centrifugation à faible vitesse (1600g, 20 min). La teneur en protéines est évaluée par la méthode BCA (*Bicinchoninic Acid Assay* - Sigma, F-L'Isle d'Abeau Chesnes) et l'albumine utilisée comme standard.

### **Marqueurs de peroxydation lipidique (TBARS)**

Les produits de peroxydation lipidique sont des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS). Ces TBARS sont évalués dans le plasma selon la méthode de Quintanilha *et al.* [28] et, dans les organes, selon la méthode d'Ohkawa *et al.* [29], en utilisant la spectrophotométrie et avec, comme standard, le malondialdéhyde (MDA). Les résultats sont exprimés en nanomoles de TBARS par litre pour le plasma, et en micromoles par gramme de protéines pour les organes.

### **Mesure de l'activité des enzymes radicalaires (SOD, GPx et GR), GSH (glutathion réduit) et GSSG (glutathion total)**

Nous avons mesuré l'activité de l'enzyme SOD1, à 412 nanomoles, en évaluant le degré d'inhibition de la formation des nitrites [30]. La glutathion peroxydase a été déterminée selon la méthode de Plagia et Valentine [31], en utilisant du cumène hydroperoxyde comme substrat. La glutathion réductase (GR) a été déterminée d'après Goldberg et Spooner [32] : la GR catalyse la réduction de GSSG en présence de NADPH qui est oxydé en NADP+.

La baisse de l'absorption est mesurée à 340 nm. L'activité enzymatique est exprimée en unités par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéines dans les tissus. Toutes les activités enzymatiques sont lues à l'aide du lecteur de microplate IEMS (KRL Reader, Kirial SA, F-Couternon). Le GSH (des RBCs et des tissus) est mesuré selon la procédure d'Anderson [33], en utilisant le glutathion comme standard. Les concentrations en GSSG sont déterminées selon la méthode de Jocelyn [34].

### **Capacité totale antiradicalaire du sang total, des érythrocytes et du plasma**

Elle a été mesurée en évaluant le taux d'hémolyse des cellules (test KRL®) dans une microplaque KRL, selon la méthode de Prost [18, 21].

Le sang total et les RBCs lavées sont dilués (v:v 1:25 et 1:50) avec du tampon KRL (300 mosm/L). 50 µL de sang total ou de suspension d'hématies sont analysés dans une microplaque de 96 puits dans lesquels est pré-dosé un générateur de radicaux libres (GRL 400, Kirial Sa, Couternon, France). La cinétique de la résistance d'un échantillon à l'hémolyse est déterminée en contrôlant l'évolution de l'absorbance à 620-nm, à 37°C. La valeur utilisée comme standard et référence est le temps d'une demi-hémolyse (T1/2 hémolyse), exprimée en minutes.

Une autre application de la méthode consiste à déterminer le statut antiradicalaire du plasma, par incubation d'échantillon de plasma de rat avec des hématies, afin de tester la capacité antiradicalaire globale circulante des organismes. Pour cela, du

sang témoin d'un rat Wistar et des échantillons de plasma de l'ensemble des rats utilisés pour l'expérience ont été dilués dans une solution de tampon KRL (300mosm/L, v:v sang standard 1:25 et plasma 1:12). Puis, 50 µL de sang standard et 50 µL de plasma de rats sont répartis dans la microplaque KRL (dont les puits contiennent le générateur de radicaux libres pré-dosés).

### Capacité antiradicalaire totale des organes

En déterminant le statut antiradicalaire total des organes, il est possible d'évaluer la capacité de l'ensemble de l'organisme à résister au stress oxydatif [25].

Pour cela, les organes de rats ont été décongelés, lavés dans 150 mmol/L de NaCl, homogénéisés dans un appareil Potter Elvehjem (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) avec 0,1 mol/L de solution phosphate à pH 7,4 [cœur : 100mg/2mL – muscle du mollet : 100mg/mL – foie : 100mg/5mL – cerveau 100mg/0.5mL – rein : 100mg/10mL – tissu adipeux : 100mg/0.2mL], centrifugé pendant 10 minutes à 3000 g. Une microplaque enduite d'un générateur de radicaux libres a été réhydratée avec une solution de tampon KRL (120 µL), puis 50 µL de surnageant est ajouté dans chaque puits à 50 µL de RBCs témoins (100 µL/5mL de tampon KRL). Les RBCs témoins sont préparés dans les mêmes conditions que les RBCs expérimentaux. La cinétique de l'hémolyse est déterminée à une longueur d'onde de 540 nm et à une température de 37°C. Les résultats finaux ont été convertis en EAR (*Equivalent Antioxydant*

*Capacity*) et exprimés en unité par milligramme de protéine [35].

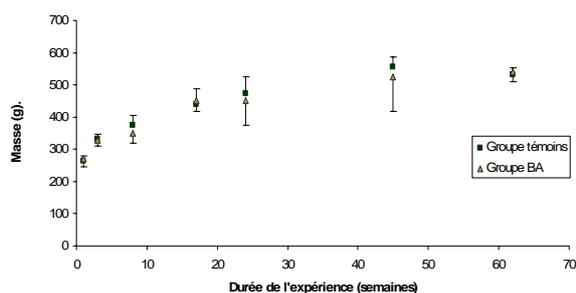
### Analyse statistique

Nous avons utilisés le logiciel Statistica 5 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) pour l'analyse statistique des données. Ces dernières sont présentées sous forme de moyenne avec leurs écart-types ( $\pm$  SD). Les tests statistiques utilisés sont les tests Anova Manova à une ou plusieurs variances. La différence entre les groupes est significative pour  $p < 0.05$ .

## RESULTATS

### Poids corporels et poids des organes.

Comme le montre la figure 1, nous n'avons pas noté de différence dans la masse corporelle des rats des deux groupes. Groupe témoin : 451.73 g  $\pm$  67.6 et groupe Bol d'Air®: 444.26 g  $\pm$  55.21 ( $p = 0.80$ ). Cependant, l'analyse multivariée met en évidence un léger effet amincissant du Bol d'Air® au cours du temps ( $p = 0.04$  en intégrant les variables groupe et temps). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux groupes pour la masse des organes (groupe témoins vs groupe BA) : Cerveau : 1.98 g  $\pm$  0.11/1.88 g  $\pm$  0.9 – cœur : 1.25 g  $\pm$  0.2/1.34 g  $\pm$  0.1 – rein : 1.45 g  $\pm$  0.2/1.49 g  $\pm$  0.1 et foie 15.80 g  $\pm$  1.7/17.27 g  $\pm$  0.97.



Sur une période de 62 semaines, 10 rats mâles Wistar sont randomisés en deux groupes : le groupe Bol d'Air® (groupe BA – triangle gris) respiraient régulièrement les terpènes peroxydés délivrés par l'appareil Bol d'Air® tandis que les rats de l'autre groupe respiraient de la vapeur d'eau (groupe témoins – carrés noirs), pendant 9 minutes, à une fréquence de 1 à 12 sessions par mois. Les animaux étaient pesés chaque semaine. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SD ;  $n = 5$ /groupe de T0 à T45W (= 45<sup>ème</sup> semaine de l'expérience) et  $n = 4$ /groupe de T45W à la fin de l'expérience.

**Figure 1.** Evolution de la masse des rats au cours de l'expérience (entre la 1<sup>ère</sup> et la 62<sup>ème</sup> semaine de l'expérience).

### Niveau des antiradicalaires dans les principaux organes

Comme le montre le tableau 1, les niveaux de

**Tableau 1 :** niveau de SOD1 dans les organes à la fin de l'expérience et dans les RBCs pendant l'expérience. Influence du traitement Bol d'Air®.

SOD for organs (U/g protein) at the end of experiment (week 62)		
Organs	Control	BA
Liver	19.47 $\pm$ 15.2	12.91 $\pm$ 5.4 <sup>NS</sup>
Heart	0.15 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>NS</sup>
Brain	7.36 $\pm$ 3.13	8.72 $\pm$ 2.93 <sup>NS</sup>
Kidney	754.73 $\pm$ 550.2	987.16 $\pm$ 532.5 <sup>NS</sup>
Adipose tissue	0.11 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.001 <sup>NS</sup>
Muscles	1.44 $\pm$ 0.09	1.82 $\pm$ 0.52 <sup>NS</sup>
SOD for RBC (U/mg Hb) during the experiment		
Times	Control	BA
T21W	1160.23 $\pm$ 654.8	530.52 $\pm$ 394.5 <sup>NS</sup>
T27W	522.28 $\pm$ 247.9	494.33 $\pm$ 158.7 <sup>NS</sup>
T31W	574.20 $\pm$ 524.3	304.51 $\pm$ 252.2 <sup>NS</sup>
T45W	690.51 $\pm$ 481.8	1494.55 $\pm$ 1076.7 <sup>NS</sup>
T62W	797.5 $\pm$ 540.8	604.1 $\pm$ 355.95 <sup>NS</sup>

De T0 à T62W (62<sup>ème</sup> semaine de l'expérience), 10 rats mâles Wistar sont randomisés en deux groupes : le groupe Bol d'Air® (BA) respirent régulièrement les terpènes peroxydés délivrés par l'appareil et les rats du groupe témoin (Control) respirent de la vapeur d'eau, pendant 9 minutes. Le sang est régulièrement prélevé de T21W (21<sup>ème</sup> semaine de l'expérience) à T45W, 3 à 8 jours après la précédente session respiratoire et 21 jours après la précédente session respiratoire en ce qui concerne les prélèvements de fin d'expérience. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SD ;  $n = 5$ /groupe de T0 à T45W (= 45<sup>ème</sup> semaine de l'expérience) et  $n = 4$ /groupe de T45W à la fin de l'expérience. L'activité des enzymes est exprimée en unités par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéine dans les tissus. N = significatif ; NS = non significatif.

Nous mesurons l'activité de la SOD1 à 412 mn en évaluant le degré d'inhibition de la formation des nitrites [30]. hydroperoxyde

Cu/Zn SOD dans les organes ne diffèrent pas d'un groupe à l'autre, bien que nous ayons trouvé un niveau légèrement plus élevé dans le groupe Bol d'Air® à T45W. Il n'y a pas de différence statistique significative entre les deux groupes quant aux niveaux de Cu, Zn-SOD dans les RBCs lors de l'expérience.

Comme le montre le tableau 2, l'analyse du taux de SOD en fonction de la fréquence des sessions respiratoires avant la prise de sang n'est pas significative pour le groupe témoins, mais elle le devient pour le groupe BA. Dans ce groupe, plus le nombre de sessions de respiration était grand, plus le niveau de SOD est élevé.

**Tableau 3 :** Niveaux de glutathion peroxydase (GPx) dans les RBCs en cours d'expérience et dans les organes en fin d'expérience. Influence du traitement Bol d'Air®.

GPx (U/g tissue at the end of experiment (T62W))		
Organs	Control	BA
Liver	1432.29 $\pm$ 267.3	1377.29 $\pm$ 235.9 <sup>NS</sup>
Heart	313.34 $\pm$ 42.5	362.88 $\pm$ 57.1 <sup>NS</sup>
Brain	74.80 $\pm$ 9.7	86.41 $\pm$ 21.6 <sup>NS</sup>
Kidney	4262.99 $\pm$ 213.6	4579.02 $\pm$ 275.5 <sup>NS</sup>
Adipose tissue	133.53 $\pm$ 22.4	221.57 $\pm$ 89.2 <sup>NS</sup>
Muscles	5389.00 $\pm$ 4778.4	7166.49 $\pm$ 3250.4 <sup>NS</sup>
GPx for RBC (U/mg Hb) during the experiment		
Times	Control	BA
T21W	1559.47 $\pm$ 65.4	1496.31 $\pm$ 132.6 <sup>NS</sup>
T27W	1815.36 $\pm$ 148.2	1884.43 $\pm$ 113.1 <sup>NS</sup>
T31W	1920.07 $\pm$ 57.7	1962.81 $\pm$ 91.2 <sup>NS</sup>
T45W	4056.30 $\pm$ 3014.3	3005.12 $\pm$ 768.4 <sup>NS</sup>
T62W	6025.25 $\pm$ 940.8	5391.04 $\pm$ 979.4 <sup>NS</sup>

Nous mesurons l'activité de la GPx par la méthode de Plagia et Valentine [31], en utilisant du cumène comme substrat.

**Tableau 2.** Niveaux d'activité de la Super Oxyde Dismutase (SOD), de T21W à T62W, pour le sang total des rats témoins (Control) et Bol d'Air® (BA).

Number of sessions before blood collection	SOD for RBC (U/mg HB during the experiment)				
	Control		BA		
0.5		797.46±540.80	604.07±355.90		
1	p = 0.77	p = 0.88	752.23±555.20	443.12±283.50	p = 0.60
3		p = 0.83	690.51±481.80	1494.55±1076.70	p = 0.0011*

Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1.

Nous mesurons l'activité de la SOD1 à 412 mn en évaluant le degré d'inhibition de la formation des nitrites [30].

Les valeurs représentent les moyennes + SD ; n = 5/groupe de T0 à T45W (= 45ème semaine de l'expérience) et n = 4/groupe de T45W à la fin de l'expérience. L'activité des enzymes est exprimée en unité par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéine dans les tissus. N = significatif ; NS = non significatif

**Tableau 4 :** niveaux de glutathion réductase (GR) dans les principaux organes à la fin de l'expérience et des RBCs pendant l'expérience. Influence du traitement BAJ.

Organs	GR (U/g tissue at the end of experiment (T62W))	
	Control	BA
Liver	3658.00±121.7	3476.38±389.7 <sup>NS</sup>
Heart	6720.46±3859.7	3475.31±741.0 <sup>NS</sup>
Brain	77.86±15.6	91.08±20.5 <sup>NS</sup>
Kidney	40489.10±33155.3	64954.02±29232.5 <sup>NS</sup>
Adipose tissue	1049.57±325.4	1942.73±688.7 <sup>NS</sup>
Muscles	212.21±743.5	5942.12±1899.3 <sup>*</sup>

Time	GR for RBC (U/mg Hb) during the experiment	
	Control	BA
T21W	237.81±23.5	218.69±12 <sup>NS</sup>
T27W	255.91±60.9	298.78±120.4 <sup>NS</sup>
T31W	247.21±17.0	253.99±16.6 <sup>NS</sup>
T45W	624.87±97.7	818.77±197.9 <sup>*</sup>
T62W	125.6±36.9	106.16±32.8 <sup>NS</sup>

Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. La glutathion réductase (GR) a été déterminée d'après Goldberg et Spooner [32]. Les valeurs représentent les moyennes + SD ; n = 5/groupe de T0 à T45W (= 45ème semaine de l'expérience) et n = 4/groupe de T45W à la fin de l'expérience. L'activité des enzymes est exprimée en unités par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéine dans les tissus. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif.

Les données du tableau 3 indiquent que le niveau GPx dans les principaux organes des rats Bol

d'Air® est plus élevé que dans le groupe témoin, mais de manière non statistiquement significative. L'analyse multivariée montre une signification sur la durée (p = 0.0024), mais non reliée à l'effet Bol d'Air® ou pour les deux effets combinés. Le groupe BA augmente considérablement l'activité GR dans les muscles (p = 0.005) mais pas dans les autres organes (tableau 4).

Pour chaque analyse de sang, nous n'avons pas constaté de différence entre les deux groupes de rats, excepté à T45W (p = 0.037). L'analyse multivariée met en évidence l'action de l'appareil sur l'activité GR dans le sang (p = 0.01) au cours du temps. Les ratios GR/SOD, GPx/SOD et GPx/GR ne diffèrent pas entre les 2 groupes pour les RBCs ou pour les principaux organes en cours d'expérience, excepté pour le ratio GR/SOD pour les muscles : témoin = 201.90 ± 59.9 ; BA = 461.42 ± 198.1 (p=0.004). De la même manière, aucune différence n'a été constatée entre les groupes quant aux niveaux et ratios de GSH et GSSG pour les organes (Tableau 5), tout comme dans les niveaux TBARS des organes (Tableau 6).

**Tableau 5 :** Taux du glutathion réduct (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG) dans les principaux organes à la fin de l'expérience (T62W). Influence du traitement Bol d'Air®.

Organs	GSH (U/g protein)		GSSG (U/g protein)		GSH/GSSG	
	Control	BA	Control	BA	Control	BA
Liver	8.20±1.3	8.40±0.5 <sup>NS</sup>	4.17±0.6	4.73±0.3 <sup>NS</sup>	1.96±0.1	1.77±0.1 <sup>NS</sup>
Heart	3.29±0.5	2.75±0.6 <sup>NS</sup>	1.78±0.05	2.01±0.3 <sup>NS</sup>	1.85±0.3	1.43±0.5 <sup>NS</sup>
Brain	0.62±0.1	0.59±0.09 <sup>NS</sup>	0.06±0.07	0.06±0.07 <sup>NS</sup>	18.16±11.4	15.07±8.2 <sup>NS</sup>
Kidney	7.37±0.5	7.83±0.3 <sup>NS</sup>	2.70±0.2	2.74±0.1 <sup>NS</sup>	2.72±0.1	2.86±0.1 <sup>NS</sup>
Adipose tissue	0.05±0.005	0.11±0.08 <sup>NS</sup>	0.14±0.01	0.29±0.2 <sup>NS</sup>	0.38±0.009	0.39±0.004 <sup>NS</sup>
Muscle	1.19±0.06	1.59±0.6 <sup>NS</sup>	1.13±0.08	1.48±0.6 <sup>NS</sup>	1.06±0.05	1.069±0.02 <sup>NS</sup>
RBC	693.51±126.4	614.37±48.3 <sup>NS</sup>	1080.30±150.8	959.42±88.2 <sup>NS</sup>	639.84±57.2	641.07±19.3 <sup>NS</sup>

Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Les valeurs représentent les moyennes ± SD ; n = 4/groupe. Le glutathion est exprimé en unités par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéine dans les tissus. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif.

**Tableau 6 :** Taux des TBARS dans les principaux organes à la fin de l'expérience (T62W). Influence du traitement Bol d'Air®.

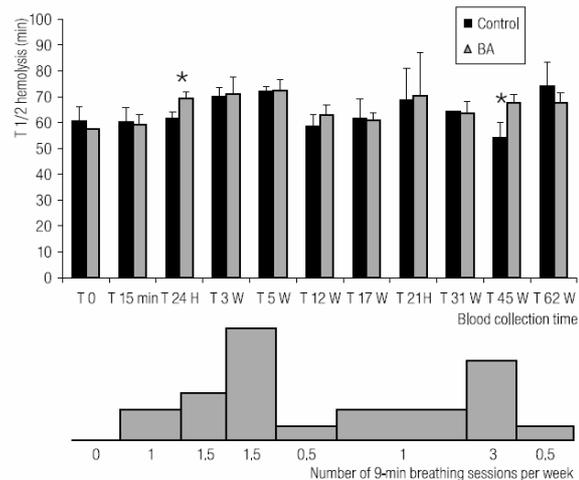
Organs	TBARS (U/g protein)	
	Control	BA
Liver	118.99±103.9	34.41±11.4 <sup>NS</sup>
Heart	98.04±11.9	130.94±46.1 <sup>NS</sup>
Brain	324.63±69.3	347.83±53.4 <sup>NS</sup>
Kidney	8.11±6.2	16.74±19.8 <sup>NS</sup>
Adipose tissue	108.39±78.4	247.92±141.3 <sup>NS</sup>
Muscle	10.58±3.9	10.16±1.9 <sup>NS</sup>

Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Les TBARS sont détectés par réaction avec l'acide thiobarbiturique, d'après la méthode d'Ohkawa et al. [29]. Les valeurs représentent les moyennes ± SD ; n = 4/groupe. Le glutathion est exprimé en unités par milligramme dans l'hémoglobine et en unité par gramme de protéine dans les tissus. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif. Les valeurs représentent les moyennes ± SD ; n = 5/groupe de T0 à T45W (= 45ème semaine de l'expérience) et n = 4/groupe de T45W à la fin de l'expérience.

### Capacité antiradicalaire totale

Lorsqu'elle est évaluée avec le test KRL, la capacité antiradicalaire du sang total ne montre pas de différence significative entre les deux groupes (p = 0.72), mais l'analyse multivariée met en évidence une action antiradicalaire de l'appareil au cours du

temps (p = 0.04, figure 2). Cette dernière figure montre également une action significative du Bol d'Air® à T24H et à T45W.

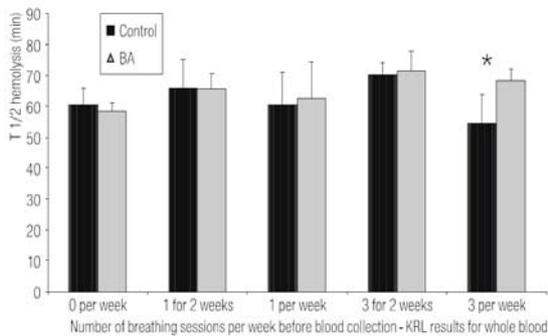


Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Le sang est prélevé à T0, T15M (15 min après la première session respiratoire), T24H (après 24 h), T3W, T5W, T12W, T17W, T21W, T26W, T31W et T45W, de 3 à 8 jours après la précédente inhalation et après 21 jours à T62W (fin de l'expérience) 21 jours. La capacité antiradicalaire globale du sang est évaluée selon la méthode de Prost [18] et de Blache et Prost [21]. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif.

**Figure 2.** Evolution du statut antiradicalaire sanguin KRL dans les groupes témoins (Control) et Bol d'Air® (BA) en fonction des prélèvements sanguins. Influence du traitement Bol d'Air®.

L'analyse du statut antiradicalaire en fonction de la fréquence hebdomadaire des sessions respiratoires montre que le Bol d'Air® peut avoir un effet dose-dépendant (effet groupe BA/témoin :  $p = 0.0345$  ; effet nombre de session/semaine :  $p = 4.8 \cdot 10^{-9}$  ; effet combiné :  $p = 0.0013$ ).

Plus précisément, une fréquence élevée de sessions respiratoires hebdomadaires n'a pas d'effet chez les rats jeunes ou adultes ( $p = 0.53$ ). Mais une fréquence de 3 sessions par semaine a un effet significatif sur les rats âgés ( $p = 0.015$ ) (voir Fig3).

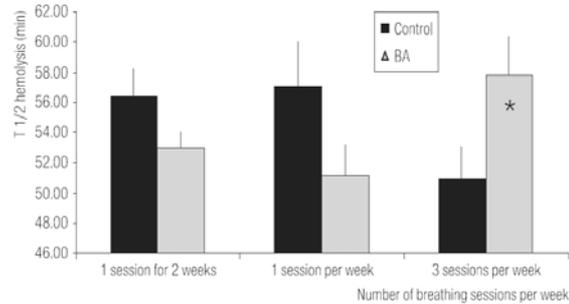


Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Le sang est prélevé à T0 (pas de session), après une session pour deux semaines, 1 session par semaine, 3 sessions pour deux semaines et 3 sessions respiratoires par semaine. La capacité antiradicalaire globale du sang est évaluée selon la méthode de Prost [18] et de Blache et Prost [21]. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif.

**Figure 3.** Evolution du statut antiradicalaire sanguin KRL dans les groupes témoins (Control) et Bol d'Air® (BA) en fonction du nombre de sessions respiratoires précédant le prélèvement sanguin. Influence du traitement Bol d'Air®.

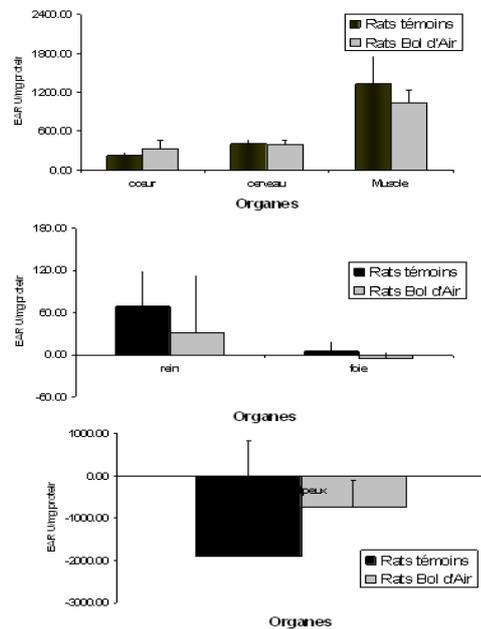
Nous ne constatons pas de différences significatives entre les deux groupes quant à la capacité antiradicalaire des RBCs ( $p = 0.72$  - voir figure 4), mais, là aussi, l'analyse multivariée met en évidence un effet antiradicalaire positif de l'appareil sur la durée ( $p = 0.004$ ). De manière plus précise, le Bol d'Air® a une influence significative

à T45W, après 3 sessions par semaine sur deux mois ( $p = 0.03$ ).



Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Le sang est prélevé à T0 (pas de session), après une session pour deux semaines, 1 session par semaine, 3 sessions pour deux semaines et 3 sessions respiratoires par semaine. La capacité antiradicalaire globale du sang est évaluée selon la méthode de Prost [18] et de Blache et Prost [21]. \* < 0.05 - N = significatif ; NS = non significatif.

**Figure 4.** Evolution du statut antiradicalaire KRL dans les groupes témoins (Control) et Bol d'Air® (BA) pour les RBCs, en fonction du nombre de sessions respiratoires précédant le prélèvement sanguin. Influence du traitement Bol d'Air®.



Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. En fin d'expérience, les rats ont eau et nourriture ad libitum. Leur dernière session respiratoire date de 21 jours.

**Figure 5.** Statut antiradicalaire des principaux organes des rats en fin d'expérience. Influence du traitement Bol d'Air®.

Il n'existe pas de différence significative entre les capacités antiradicalaires des organes des rats Bol d'Air par rapport aux rats témoins (cf. figure V).

Le tableau 7 présente une synthèse de l'évolution des données obtenues pendant l'expérience.

**Tableau 7 :** Evolution de l'ensemble des paramètres de T21W à T62W. Influence du traitement Bol d'Air®.

Data evolution during the experiment											
Time	T21W		T27W		T31W		T45W		T62W		
Group	Control	BA	Control	BA	Control	BA	Control	BA	Control	BA	
SOD	<->	<->	.	.	.	.	.	.	.	.	
		>		>		>		<		>	
GPx	<->	<->	.	.	.	.	.	.	.	.	
		>		<		<		<		>	
GR	<->	<->	.	.	<->	.	.	.	.	.	
		>		<		<		<*		>	
RBC KRL	<->	<->	.	.	.	.	.	.	.	.	
		>				>		<*		>	
Blood KRL	.	.	.	.	.	.	.	.	.	<->	
		<->				<->		<*		>	
BA sessions											

Pour la description de l'expérience, voir la légende du tableau 1. Les évolutions des activités des enzymes SOD1, GPx et GR ainsi que la capacité antiradicalaire globale KRL du sang total et des RBCs sont évaluées, entre T21W et T62W. \*p < 0.05.

## DISCUSSION

### Masse des rats

Chez les mammifères, et particulièrement chez les rats Wistar, le vieillissement est associé à une augmentation du poids, due à l'accumulation de tissus adipeux [36]. Le Bol d'Air® a un effet amincissant global, mais pas sur les organes. Ce résultat peut être lié aux 2 hypothèses suivantes :

- selon certains auteurs [37], la peroxydation des lipoprotéines LDL est réduite en présence des terpènes issus des conifères,
- l'étude du Professeur de Cristofaro et de son équipe [38] démontre que l'amélioration de la biodisponibilité du dioxygène tissulaire, grâce au

Bol d'Air®, améliore l'élimination de la masse grasseuse corporelle.

Malheureusement, il est impossible d'évaluer la masse grasseuse totale des rats car elle est en général répartie dans tout le corps et donc difficile à isoler.

### Niveau des antiradicalaires dans les organes principaux

#### SOD

La dismutation enzymatique du radical superoxyde O<sup>o</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'enzyme ubiquitaire SOD a été caractérisée par McCord et Fridovich en 19691 [39]. Il existe 3 formes de SOD. Parmi elles,

l'enzyme contenant du cuivre et du zinc (Cu,Zn SOD) est largement distribuée et compte pour 90 % des SOD existantes. Cette enzyme a une haute signification physiologique et un fort potentiel thérapeutique [40]. Dans les cellules animales, la Cu,Zn SOD est principalement localisée dans le cytoplasme et les compartiments nucléaires cellulaires et, dans une moindre mesure, dans les lysosomes et la membrane interne de la mitochondrie.

L'interprétation de l'activité SOD varie. Pour Kondo *et al.* [43], une augmentation du niveau de Cu, Zn-SOD pourrait refléter une augmentation de la production d'anions superoxyde (dans le cytoplasme plutôt que dans la mitochondrie). L'activité SOD est plus élevée chez les personnes exposées au stress, comme dans le cas de l'entraînement sportif professionnel d'endurance (augmentation de l'activité SOD dans les RBCs). Chez les souris, une teneur anormalement élevée de Cu,Zn SOD réduit leur durée de vie, comme c'est le cas chez les personnes atteintes du syndrome de Down [45]. Parfois, et surtout dans l'évolution des maladies pulmonaires, les résultats sont différents : l'asbestose ou la sarcoïdose entraînent une augmentation de l'activité SOD, alors qu'aucun changement n'est observé au cours de la silicose ou en cas de lésions hyperoxiques des poumons [46]. Singh *et al.* [47] démontre que le cerveau d'un groupe de rats traités avec le tonique herbominéral Geriforte®, traditionnellement utilisé pour les problèmes de santé des personnes âgées en Inde, présente des niveaux d'activité de la SOD

significativement supérieurs à ceux du groupe témoins.

Ainsi, dans notre étude, les niveaux de Cu,Zn SOD dans les deux groupes de rats ne permettent pas de déterminer si l'appareil Bol d'Air® génère ou pas un stress oxydatif. La conclusion définitive est donc liée à d'autres paramètres.

Parmi les différents types de SOD, d'autres études peuvent être envisagées, par exemple l'évaluation de l'activité de la Mn-SOD. En effet, les facteurs de transcription impliqués dans l'induction de la Mn-SOD sont sensibles à l'oxydoréduction. En conséquence, le stress oxydatif peut être un facteur important pour déterminer l'expression transcriptionnelle de cette enzyme [48, 49]. Cette dernière est une protéine présente dans la mitochondrie, et elle est impliquée dans la détoxification de radicaux superoxydes produits par les chaînes de transport d'électrons mitochondriales au cours du processus métabolique normal de la cellule [50-52]. Une déficience ou une diminution de l'activité Mn-SOD et des enzymes Cu,Zn SOD ont été associées à de nombreuses maladies, comme la sclérose latérale amyotrophique héréditaire [53], le vieillissement [54], et le cancer [55, 56]. L'induction de la production de Mn-SOD chez les animaux semble être un processus physiologique répondant à des stress environnementaux et pathologiques [57]. Les radiations ionisantes activent les gènes de la Mn-SOD aussi bien dans les tissus cardiaques des souris que dans les fibroblastes humains [58, 59]. Il est démontré également que, dans plusieurs types cellulaires, cette activation est en rapport avec de nombreux

agents chimiques et cytokines, incluant le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*), l'IFN- $\gamma$  (interféron gamma), et IL-1 (interleukine-1) [60, 61]. Toutefois, il peut arriver que l'augmentation de l'activité Mn-SOD ne soit pas accompagnée de l'augmentation des autres produits antiradicalaires [62]. Ou encore, certains médicaments, comme le cisplatine, génère une augmentation de l'activité de la Mn-SOD mais une diminution de la Cu,Zn-SOD [63]. Selon Liu *et al.* [64], l'induction de la Mn-SOD par des messagers comme le TNF- $\alpha$  passe en partie par la formation de radicaux libres centrés sur l'oxygène (ROS). D'un autre côté, l'augmentation de l'activité de la Mn-SOD par l'IL-1 *via* le NF- $\kappa$ B est oxydant-dépendante [65], laissant supposer que toutes les différentes voies de signalisation intercellulaire (qui conduisent à la diffusion de transcription Mn-SOD) sont régulées différemment.

Une recherche plus détaillée pourrait être menée, et la compréhension de l'effet possible du Bol d'Air® sur la régulation de la Mn-SOD pourrait amener une meilleure compréhension de son impact sur la régulation cellulaire.

### **Le système glutathion**

C'est le mécanisme central permettant la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'élimination de nombreuses variétés de peroxydes toxiques [66]. Une déficience de ce système contribue au stress oxydatif [67], et les cellules non affectées par le stress maintiennent un ratio élevé de GSH/GSSG pour assurer la biodisponibilité des GSH. Ces derniers servent de

donneurs d'électrons. L'enzyme clé, dans le cycle d'oxydoréduction responsable de la diminution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, est la GPx.

Le GSSG formé au cours de la réaction est régénéré par la GR pour reformer du GSH. La GR utilise comme donneur d'électrons le NADPH, issu des réactions basées sur les hexoses monophosphates [68]. Le GSH réagit avec des radicaux libres et des peroxydes organiques et il sert d'antiradicalaire dans le système de transport des acides aminés et comme un substrat pour le GPx et le GSSG [69].

### **GPx et GR**

Globalement, l'activité GR est plus élevée que celle des GPx et nous obtenons quelques résultats significatifs. Cette situation est déjà connue chez l'Humain : Bazzichi *et al.* [70] démontre que les niveaux de GR sont 3 fois plus élevés chez les patients ayant des rhumatismes articulaires que chez les patients présentant de l'ostéoarthrite. Selon ces auteurs, l'augmentation d'activité lors du processus inflammatoire peut conduire à un effet légèrement protecteur. D'autres chercheurs ont observé une stimulation significative de l'activité GR dans les muscles squelettiques de souris infectées par *T. spiralis* [71]. Comme l'a mentionné Dudley *et al.* [72], les muscles d'une souris non dystrophique soumis à un stress de type ischémie/reperfusion et ceux de souris dystrophiques montrent une meilleure activité des enzymes GR (ainsi que des GPx). Ainsi, selon ces résultats, le stress implique des niveaux de GR élevés.

Yang *et al.* [73] a montré que les activités GR et GPx sont importantes dans la prévention de l'état d'oxydoréduction des tissus. Ils ont évalué l'activité de ces enzymes dans deux lignées de cellules avec différentes hypersensibilités au stress oxydatif. Les résultats laissent supposer qu'une faible activité enzymatique, liée au faible pouvoir réducteur du NADPH/NADP [+], provoque une hypersensibilité au stress oxydatif. Ainsi, nous pourrions conclure que l'augmentation des niveaux de GR chez les rats âgés après des sessions respiratoires de Bol d'Air® évoque un effet antiradicalaire agissant comme un stress positif.

De plus, étant donné la relation étroite entre GR, NADPH/ NADP [+] et G6DP, d'autres recherches seraient envisageables afin d'évaluer l'impact de l'appareil sur le métabolisme du glucose.

### **GSH/GSSG et TBARS**

Puisqu'il n'y a pas de différence entre des deux groupes en ce qui concerne les taux de GSH et GSSG, les différents ratios ainsi que dans les niveaux TBARS des organes, le stress apparent pendant l'expérience pourrait avoir eu un effet vraiment bénéfique. Ceci pourrait être prouvé par l'évolution du statut antiradicalaire ou par des évaluations complémentaires de la peroxydation lipidique. En effet, les produits de peroxydation lipidique sont formés par l'extraction d'un atome d'hydrogène à partir d'un acide gras insaturé. Les doubles liaisons se transforment en diènes. Une attaque par de l'oxygène moléculaire produit un lipide peroxydé qui peut extraire un atome d'hydrogène d'un lipide adjacent pour former un

lipide hyperoxyde. Certains d'entre eux sont transitoires, comme l'hydroxynonenol, tandis que d'autres apparaissent plus tard et s'accumulent, comme le Malondialdéhyde [74-76]. Ce MDA est mis en cause dans les processus de vieillissement [77-80], dans l'athérosclérose [81-86], la maladie d'Alzheimer [87-88] et le cancer [89]. Le MDA plasmatique est donc bien été utilisé comme un biomarqueur de peroxydation lipidique et sert d'indicateur des dommages causés par les radicaux libres. Lorsqu'on le chauffe dans des conditions acides, l'acide thiobarbiturique [TBA] réagit avec de très nombreuses espèces chimiques (acides nucléiques, phospholipides, aldéhydes, protéines et autres acides aminés [90]) pour produire un chromophore rose qui peut être mesuré par UV ou détection fluorescente. Ces substances sont nommées TBARS. Depuis Yagi [91], qui a utilisé le taux de TBA pour évaluer les concentrations de lipoperoxydes dans le sérum humain, la détection des TBARS est devenue une méthode courante, et c'est ce qui a été dosé dans nos expérimentations.

Cependant, ces dernières années, cette méthode a été critiquée à plusieurs titres, particulièrement à cause de l'existence d'une large gamme de produits d'oxydation non lipidiques qui réagissent aussi avec les TBARS pour former des espèces colorées qui peuvent interférer avec l'analyse. Selon Draper *et al.*, excepté pour l'urine, l'analyse spectrométrique a surestimé le contenu en MDA. La purification du complexe TBA-MDA obtenu à partir de foie et de farine de poisson met en évidence dans l'extrait de TCA (acide trichloroacétique) une élimination de

produits complexes, composés de peptides résiduels [92].

La question qui découle de ces observations est de savoir si les TBARS représentent un produit de peroxydation lipidique, ou les métabolites finaux de nombreuses « voies métaboliques », dont la peroxydation lipidique et des métabolismes des acides gras polyinsaturés [93]. Cependant, beaucoup de chercheurs continuent de considérer les TBARS comme des biomarqueurs de la peroxydation lipidique, dans de nombreuses expériences (poissons [94], rats [95-96], chiens [97], cellules [98] et humains [99]).

### Capacité antiradicalaire totale

La variation des statuts antiradicalaires KRL observés au cours de l'expérience, d'un prélèvement à l'autre, (et qui variait dans le même sens chez les deux groupes), peut être liée aux rythmes saisonniers. En effet, les rythmes saisonniers et circadiens sont reliés, chez les rongeurs, à un système d'oscillation soutenu par le noyau suprachiasmatique [100]. Prost *et al.* [101] et Narce *et al.* [102] ont observé ces activités saisonnières chez les rats Wistar et chez les souris.

Si l'on compare la capacité antiradicalaire totale des deux groupes, nous observons des résultats significatifs supérieurs pour les rats Bol d'Air® à T24H et à T45W.

Chez les organismes au repos, un équilibre se crée entre la production de ROS et la capacité cellulaire antiradicalaire. Le déséquilibre, qu'il soit dû à un statut inférieur de protection antiradicalaire ou à une augmentation du stress oxydant, génère

des modifications dans le statut redox cellulaire. Un stress léger induit généralement un déséquilibre physiologique temporaire, qui est compensé dans un délai très court [103]. Dans ce cas, l'organisme répond au stress par des augmentations importantes, mais éphémères, du niveau du taux des antiradicalaires.

Dans notre étude, les premières sessions d'inhalation du Bol d'Air® agissent comme un stimulus unique de la défense anti radicalaire, sur une courte durée.

Au cours de l'expérience, les statuts antiradicalaires KRL du sang des deux groupes sont proches. Sauf à T45W, où les taux KRL du sang total et des RBCs des rats BA sont significativement supérieurs à ceux des rats témoins. Cette période correspond au moment où la fréquence des sessions respiratoires était la plus fréquente pour les rats (3 sessions par semaine dans les deux mois précédents la prise de sang). C'est aussi un moment de l'expérience où les rats sont âgés : l'effet protecteur obtenu avec le Bol d'Air® est donc d'autant plus intéressant qu'une étude a montré que les rats âgés étaient plus sensibles à une attaque antiradicalaire que les rats adultes [104].

Les résultats de notre expérience supposent donc la présence d'un système de régulation de la capacité de défense antiradicalaire globale, probablement assurée par des réserves antiradicalaires dans les tissus. Compte tenu de ce que nous savons déjà sur la régulation de la glycémie, cette homéostasie du niveau antiradicalaire global circulant pourrait être due à la formation de réserves. Ce fait a déjà été enregistré par Prost [105]. Ce système permettrait

de maintenir un niveau normal de la capacité antiradicalaire globale. Selon la qualité de leur système adaptatif, et quand le niveau de défense antiradicalaire est élevé, les sujets emmagasinent des composés antiradicalaires pour maintenir cette homéostasie, ou, au contraire, les relâchent - lorsque cela s'avère nécessaire.

Les RBCs vivent environ 100 jours chez les Mammifères. Ils sont protégés par cette régulation plasmatique leur vie durant, mais, quand la capacité antiradicalaire globale de l'organisme est inférieure aux normes, ils subissent directement un impact négatif. Si l'on tient compte de ce point de vue, le niveau élevé de KRL pour les RBCs, après trois sessions d'inhalation de Bol d'Air® par semaine (à T45W) pourrait prouver que l'appareil a vraiment un effet antiradicalaire protecteur dose-dépendant. Dans le cas de pathologies (ou de vieillissement), le système régulateur peut être affecté et/ou les réserves peuvent faiblir, ce qui se traduit par un niveau anormalement élevé ou faible d'antiradicalaires globaux circulants. Cela expliquerait les différences observées dans les résultats des jeunes rats (T5W) et chez les rats âgés (T45W) après des sessions respiratoires fréquentes (voir figure 2) : la protection éventuelle générée par le Bol d'Air® n'est significative que par rapport au groupe témoin vieillissant. En effet, chez les jeunes rats, le système homéostatique pourrait gommer les impacts positifs de l'appareil. Une étude complémentaire doit être menée pour confirmer ces hypothèses.

De T45W à la fin de l'expérience, les rats ont eu de moins en moins de sessions respiratoires, ce qui a

diminué d'autant leurs manipulations (pesées...). Trois effets différents étaient escomptés chez le groupe Bol d'Air® : un effondrement des défenses immunitaires, un maintien à un taux élevé d'antiradicalaires, ou une harmonisation des taux avec ceux du groupe témoin. C'est cette dernière hypothèse qui s'est révélée exacte à la fin de l'expérience (T62W – voir figure 5).

Pris dans leur ensemble, ces résultats permettent de supposer que les rats BA ont été soumis à un stress positif, provoquant des adaptations métaboliques et augmentant, de ce fait, la protection contre le stress, particulièrement chez les rats âgés. Ce changement adaptatif pourrait être lié à un système régulateur de la capacité antiradicalaire globale, créant des réserves antiradicalaires. Une nouvelle étude devra confirmer cette hypothèse.

L'appareil Bol d'Air® a un effet dose-dépendant positif et un effet protecteur antiradicalaire de courte durée, sauf pour le niveau de GR, qui dure plus longtemps.

### Remerciements

Plusieurs personnes ont permis la réalisation de ce projet. Nous aimerions remercier Madame Marie-Laure Delanef, Directrice d'Holiste, Magali Wharmby, et particulièrement Philip Bastable pour la rédaction de cet article.

### REFERENCES

1. Packer L, Fuehr K. *Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cell*. Nature, 1977, 267, 423-425.

2. von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?* Exp Cell Res, 1995, 220, 1, 186-193.
3. Semenza GL. *Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1999, Vol. 15: 551-578.
4. Jacquier R. [*Facts and theories related to biocatalysis*], Revista brasileira de medicina, 1947, Vol. IV, n°7, 517-520, [*Teorias e fatos ligados a biocatalise*].
5. Savage TJ, Croteau R. *Biosynthesis of monoterpenes: regio- and stereochemistry of (+)-3-carene biosynthesis.* Arch Biochem Biophys., 1993 ;305(2):581-7.
6. Chalchat JC. "Corrélation composition chimique/activité antimicrobienne. II. Activité de trois huiles essentielles de résineux vis-à-vis de deux souches bactériennes ". Plantes médicinales et phytothérapie, 1987 ; tome XXI, N° 3, 209-217.
7. Xia Z, Mao X, Luo Y. ["Study on antifungal mechanism of alpha-pinene"] Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1999, 24(6):507-9 [*in Chinese*].
8. Grignard V., [*Handbook of organic chemistry*] 899 pp., Masson Ed., 1958, [*Précis de chimie organique*].
9. Vincent MA, Hillier IH, Salsi L. *The potential energy surfaces of N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> species: implications for selective catalytic reduction.* Phys. Chem. Chem. Phys., 2002, 2, 707-714.
10. Jacquier R. De l'atome à la vie, 392 pp., Imp. corbasienne – Rhône, 1981.
11. Sohal RS, Weindruch R. *Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging.* Science, 1996, Vol. 273. n° 5271, pp. 59 – 63.
12. Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H *et al.* *Hyperoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Pulmonary Capillary Endothelial Cells In Situ.* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2006, 34:453-463.
13. Llesuy S, Evelson P, Campos A.M, Lissi E. *Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review.* Biol. Res., 2001 vol.34, n.2 Santiago.
14. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. *Oxidants and anti-oxidants:state of the art.* Am J Med, 1991, 91:2S-13S.
15. Doelman CJ, Bast A. *Oxygen radicals in lung pathology.* Free Radic Biol Med, 1990, 9:381-400.
16. Rhodin J, Thomas T, Bryant M, Sutton ET. *Animal model of Alzheimer-like vascular pathology and inflammatory reaction.* Ann NY Acad Sci, 2000, 903.
17. Ciriolo MR, Fiskin K, De Martino A, Corasaniti MT, Nistico G, Rotilio G. *Age-related changes in Cu:Zn superoxide dismutase, Se-dependent and -independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain.* Mech Ageing Dev, 1991, 31;61(3):287-97.
18. Prost M. *Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or potentially aggressive agents.* U.S. patent no. 5,135,850. Washington, DC:U.S. Patent and Trademark Office, 1990. [Utilisation de générateurs de radicaux libres dans le domaine des dosages biologiques]. FR patent 2,642,526, 1989.
19. Frenoux JM, Noirot B, Prost ED, Madani S, Blond JP, Belleville J *et al.* *Very high alpha-tocopherol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hypertensive rats but not in normotensive rats.* Med Sci Monit., 2002, 8(10):BR 401-7.
20. Krouf D, Bouchenak M, Mohammedi B, Cherrad A, Belleville J, Prost J. *Changes in serum lipids and antioxidant status in west Algerian patients with essential hypertension treated with acebutolol compared to healthy subjects.* Med Sci Monit., 2003, 9(8):PI109-15.
21. Blache D, Prost M. Free radical attack: Biological test for human resistance capability. *In: Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution: A lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL, 1989).* C. Ponnampuruma and C.W. Gehrke, editors, 1992. NASA, Washington D.C., pp. 82-98.
22. Girodon F, Blache D, Monget AL, Lombart M, Brunet-Lecompte P, Arnaud J *et al.* *Effect of two-year supplementation with low dose antioxidant vitamins and/or minerals in elderly subjects on levels of nutrients and on antioxidant defence parameters.* J. Am. Coll. Nutr., 1997, 16:357-365.
23. Lesgards JF, Durand P, Lassare M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A *et al.* *Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects.* Environ. Health Perspect., 2002, 110:479-487.

24. Boukourt F, Girard A, Prost J, Ait Yahia D, Bouchenak M, Belleville J. *Fish protein improves the total antioxidant status of streptozotocin-induced diabetes spontaneously hypertensive rat*. Medical Science Monitor, 2004, 10:BR 397-404.
25. Girard A, Madani S, El Boustani ES, Belleville J, Prost J. *Changes in lipid metabolism and antioxidant defence status in spontaneously hypertensive rats and Whistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids*. Nutrition, 2005, 240-248.
26. American Institute of Nutrition Guidelines for describing diets for experimental animals. J. Nutr., 1987, 117:16-17.
27. CEC Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. Off J Eur Common (JO86/609/CEE), 1986, 358:1-28.
28. Quintanilha AT, Packer L, Davies JM, Racanelli TL, Davies KJ. *Membrane effects of vitamin E deficiency: bionergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria*. Ann NY Acad Sci, 1982, 393:32-47.
29. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979, 95:351-358.
30. Elstner E, Youngman R, Obwald W. Superoxide dismutase. In: Bergmeyer H.V. editor - Methods of Enzymatic Analysis. Volume 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, 1983, 293-302.
31. Plagia DE, Valentine WN. *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med, 1967; 70:158-169.
32. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Methods of Enzymatic Analysis. Volume 3. Bergmeyer H.V. editor -Verlog Chemie, Deerfield Beach, 1983; 258-265.
33. Anderson ME. *Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples*. Methods Enzymol, 1985, 113:548-555.
34. Jocelyn PC. *The Reduction of Diamide by Rat Liver Mitochondria and the Role of Glutathione*. Biochem. J., 1978, 176:649-664.
35. Rice-Evans C, Miller NJ. *Total antioxidant status in plasma and body fluids*. Methods Enzymol, 1994, 234:279-293.
36. Fernandez-Galaz C, Fernandez-Agullo T, Campoy F, Arribas C, Gallardo N, Andres A *et al. Decreased leptin uptake in hypothalamic nuclei with ageing in Wistar rats*. Journal of Endocrinology, 2001, 171 :23-32.
37. Grassmann J, Hippeli S, Spitzenberger R, Elstner EF. *The monoterpene terpinolene from the oil of Pinus mugo L. in concert with alpha-tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of LDL*. Phytomedicine, 2005;12(6-7):416-23.
38. De Cristofaro P, Campanaro P, Dragani B, Malatesta G, Pietrobelli A. *Evaluation by indirect calorimetry of the respiratory integration with alpha and beta pines peroxides*. Experimental Biology (FASEB), April 11-15, 2003, Abstracts 13.1 - A556:350-7, San Diego.
39. McCord JM, Fridovich I. *Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969, 244: 6049-6055.
40. Noor R, Mittal S, Iqbal J. *Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases*. Med Sci Monit Sep 2002;8(9):RA210-5.
41. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. *Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes*. J. Cell Biol., 1998, 107: 2169-2179.
42. Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA, Crapo JD. *Intracellular localization of the copper-zinc and manganese SODs in rat liver parenchymal cells*. Lab. Invest., 1986, 55:363-371.
43. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. *Antioxidant enzyme systems in skeletal muscle atrophied by immobilization*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1993, 422, 4.
44. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J, Campillo JE. *Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training*. Int J Sports Med., 1991, 12(6):563-566.
45. Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. *Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice*. J. Gerontol.2000, A55, B5-B9.
46. Comhair SA, Bhatena PR, Dweik RA, Kavuru M, Erzurum SC. *Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response*. Lancet 2000, 355:624.

47. Singh B, Sharma SP, Goyal R. *Evaluation of Geriforte, an Herbal Geriatric Tonic, on Antioxidant Defense System in Wistar Rats.* Ann NY Acad Sci, 717, June 1994, 170.
48. Wong GH, Kaspar RL, Vehar G. *Tumor necrosis factor and lymphotoxin: protection against oxidative stress through induction of MN-SOD.* EXS., 1996 ;77:321–33.
49. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. *Invited review: manganese superoxide dismutase in disease.* Free Radic Res, 2001;34 (4):325–36.
50. Matsuda Y, Higashiyama S, Y. Kijima Y. *Human liver manganese superoxide dismutase.* Eur. J. Biochem., 1990 ; 194, pp. 713–720.
51. Wong GHW. *Protective role of cytokines against radiation: induction of mitochondrial Mn-SOD.* Biochim. Biophys. Acta, 1995 ; 27, pp. 205–209.
52. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV. *Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor.* Cell, 1989;58 , pp. 923–931.
53. Wakai M, Mokuno K, Hashizue Y, Kato K. *An immunohistochemical study of the neuronal expression of manganese superoxide dismutase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Acta Neuropath., 1994 ; 88, pp. 151–158.
54. Cand F, Verdetti J. *Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of aging rats.* Free Radic. Biol. Med., 1989; 7, pp. 59–63.
55. Oberley LW. *Superoxide dismutase and cancer.* In: L.W. Oberley, Editor, Superoxide dismutase, CRC Press, Boca Raton, FL ,1982, pp. 127–165.
56. Oberley LW, Buettner GR. *Role of superoxide in cancer: a review.* Cancer Res., 1979; 39, pp. 1141–1149.
57. Wong GHW, Goeddel DV. *Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism.* Science, 1988; 242, pp. 941–944.
58. Oberley LW, Saint Clair DK, Autor AP, Oberley TD. *Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-ray irradiation.* Arch. Biochem. Biophys., 1987 ; 254, pp. 69–80.
59. Akashi M, Hachiya M, Paquette RL, Osawa Y, Shimizu S, Suzuki G. *Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts.* J. Biol. Chem., 1995 ; 270, pp. 15864–15869.
60. Fujii J, Taniguchi J. *Phorbol ester induces manganese superoxide dismutase in tumor necrosis factor-resistant cells.* J. Biol. Chem., 1991; 266, pp. 23142–23146.
61. Masuda A, Longo DL , Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Mutsushima K. *Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin-1.* FASEB J., 1988; 2, pp. 3087–3091.
62. Siemankowski LM, Morreale J, Briehl MM. *Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in Mn-SOD.* Free Radic Biol Med., 1999;26(7-8):919-24.
63. Mishima K, Baba A, Matsuo M, Itoh Y, Oishi R. *Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity.* Free Radic Biol Med., 2006 May 1;40(9):1564-77.
64. Liu R, Buettner GR, Oberley LW. *Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha.* Free Radic Biol Med., 2000 Apr 15;28(8):1197-205.
65. Rogers RJ, Monnier JM, Nick HS. *Tumor necrosis factor-alpha selectively induces Mn-SOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway.* J Biol Chem., 2001 Jun 8;276(23):20419-27.
66. Ross D, Norbeck K, Moldeus P. *The generation and subsequent fate of glutathionyl radicals in biological systems.* J Biol Chem, 1985, 260: 15028-15032.
67. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Nancy D, Turner N. *D Glutathione Metabolism and Its Implications for Health.* J. Nutr. 2004, 134:489-492.
68. Deneke SM, Fanburg BL. *Regulation of cellular glutathione.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1989, 257: L163-L173.
69. Kaneko T, Iuchi Y, Kawachiya S, Fujii T, Saito H, Kurachi H. *Alteration of Glutathione Reductase Expression in the Female Reproductive Organs During the Oestrous Cycle.* Biology of Reproduction, 2001, 65, 1410-1416.

70. Bazzichi L, Ciompi ML, Betti L, Rossi A, Melchiorre D, Fiorini M *et al.* *Impaired glutathione reductase activity and levels of collagenase and elastase in synovial fluid in rheumatoid arthritis.* Clin Exp Rheumatol., Nov-Dec 2002, 20(6):761-6.
71. Przydanek A, Boczon K, Wandurska-Nowak E, Wojt W, Wojtkowiak A. [*The intriguing influence of albendazole on glutathione reductase activity in the muscles from Trichinella spiralis infected mice*], Wiad Parazytol., 2004, 50(2):273-7.
72. Dudley RW, Khairallah M, Mohammed S, Lands L, Des Rosiers C, Petrof BJ. *Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2006, 291(3):R704-10.
73. Yang MS, Chan HW, Yu LC. *Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress.* Toxicology, Sept. 2006, Volume 226, Issues 2-3, Pages 126-130.
74. Pedersen WA, Chan SL and Mattson MP. *A mechanism for the neuroprotective effect of Apolipoprotein E: isoform-specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal.* J. Neurochem., 2000; 74, pp. 1426–1433.
75. Keller JN, Lauderback CM, Butterfield DA, Kindy MS, Markesbery WR. *Amyloid-beta peptide effects on synaptosomes from Apolipoprotein E-deficient mice.* J. Neurochem., 2000; 74, pp. 1579–1586.
76. Subramaniam R, Koppal T, Green M, Yatin S, Jordan B, Drake J *et al.* *The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide (25–35) toxicity but not from hydroxynonenol toxicity: Relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease.* Neurochem. Res., 1998; 23, pp. 1403–1410.
77. Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G and Butterfield DA. *Free radicals, brain aging.* Clin. Geriatr. Med., 2004; 20, pp. 329–359.
78. Marnett LJ. *Oxyradicals and DNA damage.* Carcinogenesis, 2000; 21, pp. 361–370.
79. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. *Mitochondria, oxidants, and aging.* Cell, 2005; 120, pp. 483–495.
80. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. *Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of lifestyle factors.* Clin. Chem., 1997; 43, pp. 1209–1214.
81. Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C *et al.* *Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease.* Clin. Chem., 2001; 47, pp. 887–892.
82. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA *et al.* *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.* Circulation, 1995; 91, pp. 2488–2496. ;
83. Parthasarathy S, Steinberg A. *Cell-induced oxidation of LDL.* Curr. Opin. Lipidol., 1992; 3, pp. 313–317.
84. Esterbauer H, Wag G, Puhl H. *Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis.* Br. Med. Bull., 1993; 49, pp. 566–576.
85. Witztum JL. *The oxidation hypothesis of atherosclerosis.* Lancet, 1994; 344, pp. 793–795.
86. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.* N. Engl. J. Med., 1989; 320, pp. 915–924.
87. Markesbery WR, Lovell MA. *Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease.* Neurobiol. Aging, 1998; 19, pp. 33–36.
88. Mattson MP. *Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives.* Physiol. Rev., 1997; 77, pp. 1081–1132.
89. Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ. *Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells.* J. Biol. Chem., 2003; 278, pp. 31426–31433
90. Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA. *The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde.* Lipids, 1986; 21, pp. 6–10.
91. Yagi K. *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance.* Lipid peroxides in biology and medicine, 1982, Academic Press, Inc., pp. 223–242.

92. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials*. Free Radical Biology & Medicine, 1993; 15, pp. 353–363.
93. Janero DR. *Malondialdehyde, thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury*. Free Radic Biol Med, 1990;9(6):515-40.
94. Oakes KD, Van Der Kraak GJ. *Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (Catostomus commersoni) populations exposed to pulp mill effluent*. Aquat. Toxicol., 2003; 63, pp. 447–463.
95. Morel P, Fauconneau B, Page G, Mirbeau T, Huguet F. *Inhibitory effects of ascorbic acid on dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: relationship to lipid peroxidation and oxidation of protein sulfhydryl groups*. Neuroscience Research., 1998; 32, pp. 171–179.
96. Puntel RL, Roos DH, Paixão MW, Braga AL, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB. *Oxalate modulates thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in supernatants of homogenates from rat brain, liver and kidney: effect of diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride*. Chem Biol Interact. 2007 Jan 30;165(2):87-98.
97. Vannucchi CI, Jordao AA, Vannucchi H. *Antioxidant compounds and oxidative stress in female dogs during pregnancy*. Res Vet Sci. 2007 Oct;83(2):188-93.
98. Meagher EA, Fitzgerald GA. *Indices of lipid Peroxidation in vivo: strengths and limitations*. Free Radic. Biol. Med., 2000; 28, pp. 1745–1750.
99. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. *Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea*. Sleep, 2004; 27, pp. 123–128.
100. Reinberg A. Chronobiologie et nutrition. Let Sc, 1995, IFN 36: 2-6.
101. Prost J, Poisson JP, Blond JP. *A survey of some chronobiological aspects in rodent lipid metabolism*. In: Vistas on biochemistry, edited by Greppin H, Degli Agosti R, Bonzon M, University of Geneva, 1996, 304-314.
102. Narce N, Poisson JP, Belleville J, Chanussot B. *Time course effect of protein malnutrition on hepatic fatty acids  $\Delta^6$  and  $\Delta^5$  desaturation in the growing rat*. Brit J Nutr, 60:389-402, 1988.
103. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. *Radicaux libres et stress oxydant aspects biologiques et pathologiques*, Ed TEC & Doc, 58-59, Lavoisier®, ISBN : 2-7430-0700-1, 2005.
104. Servais S, Boussouar A, Semporé B, Pequignot J, Cottet-Emard J.M, Pequignot J.M *et al.*. Colloque des Doctorants Scientifiques de Lyon, Intersciences 2002, [The old populations are more sensitive to the ozone: experimental proof] p 151 - Sciences et Avenir, janvier 2002 « Brève d'actualité », p.19 [Les populations âgées sont plus sensibles à l'ozone : preuve expérimentale].
105. Prost M. *Method for determining the antiradical defence potential and use thereof, in particular in veterinary and human preventive therapeutics*, PCT/FR2004/002716, 2006, U.S. Patent US-2006-0234329.