

Y-A-T-IL UNE RELATION ENTRE LE STATUT DU STRESS OXYDATIF ET LE VIEILLISSEMENT ?

HAMMA S.A^(1,2), FERGANI I⁽¹⁾, BENLATRECHE C^(1,2), ABADI N^(1,2).

1) Laboratoire de Biochimie, CHU Constantine, Faculté de Médecine de Constantine, Université Constantine 3.

2) Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire, Faculté de Médecine de Constantine, Université Constantine 3.

RÉSUMÉ :

Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de l'incidence de pathologies dégénératives (cancers, diabète, maladies cardiovasculaires et maladies neurodégénératives). Ces pathologies seraient favorisées par la production de radicaux libres notamment lorsque cette production dépasse les capacités de défense antioxydantes de l'organisme induisant ainsi un état de stress oxydatif. Notre objectif était d'explorer le statut du stress oxydatif des sujets présumés sains, au cours du vieillissement. Notre étude est de type cas-témoins. Elle a porté sur une population de 185 volontaires sains divisés en fonction de l'âge en deux groupes : un groupe de 95 sujets âgés de moins de 40 ans et un groupe de 90 sujets âgés de plus de 40 ans. Un bilan biochimique général a été réalisé pour les deux groupes (glucose, créatinine, cholestérol total, cholestérol HDL et cholestérol LDL). Les paramètres retenus pour l'évaluation du statut du stress oxydatif étaient : les enzymes antioxydantes érythrocytaires glutathion peroxydase (Gpx), superoxyde dismutase (SOD), les vitamines antioxydantes plasmatiques E, A et le marqueur de la peroxydation lipidique le malondialdéhyde (MDA). Les activités enzymatiques de la SOD et la Gpx ont été déterminées par spectrophotométrie et exprimées en unité internationale par gramme d'hémoglobine (UI/g Hb). Les concentrations plasmatiques des vitamines E, A et MDA ont été évaluées par chromatographie liquide haute performance en phase inversée. L'âge moyen était de 32 ± 2 ans chez la population jeune et de 50 ± 8 ans chez la population plus âgée. Les activités enzymatiques de la Gpx et SOD étaient comparables entre les deux groupes : $46,9 \pm 18,2$ UI/g Hb versus $48,9 \pm 26,6$ UI/g Hb, $p=0,798$; respectivement, pour la Gpx et 1112 ± 318 UI/g Hb versus 1111 ± 373 UI/g Hb, $p=0,596$; respectivement, pour la SOD. Il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes des concentrations plasmatiques des vitamines E et A chez les sujets jeunes et ceux plus âgés. Les concentrations plasmatiques du MDA étaient significativement plus élevées chez les sujets âgés comparés à ceux jeunes : $10,7 \pm 4,7$ $\mu\text{g/l}$ versus $9,6 \pm 6,3$ $\mu\text{g/l}$, $p=0,032$. Il n'y avait pas de corrélation entre l'âge et les différents paramètres du stress oxydatif étudiés. Nos résultats sont en faveur de l'absence de variations significatives des activités enzymatiques de la Gpx et SOD et du statut vitaminique E et A au cours du vieillissement. Par ailleurs une augmentation de la peroxydation lipidique est observée en faveur de l'installation d'un état de stress oxydatif.

Mots clés : Vieillesse, Stress oxydatif, Glutathion peroxydase, Superoxyde dismutase, Vitamine E, Vitamine A

ABSTRACT : : IS THERE A RELATIONSHIP BETWEEN THE STATUS OF OXIDATIVE STRESS AND AGEING ?

Ageing is accompanied by an increase of degenerative diseases incidence (cancers, diabetes, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases). These pathologies would be favored by the production of free radicals especially when this production exceeds the antioxidant defense capacities of the organism thus inducing an oxidative stress state. Our aim was to explore the oxidative stress status in healthy subjects during ageing. Our study is case-control. It included a population of 185 healthy volunteers divided by age into two groups: a group of 95 subjects aged less than 40 years and a group of 90 subjects aged more than 40 years. A general biochemical assessment was performed for both groups (glucose, creatinine, total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol). The parameters chosen for the evaluation of the oxidative stress status were: erythrocyte antioxidant enzymes: glutathione peroxidase (Gpx) and superoxide dismutase (SOD), plasma antioxidant vitamins E, A and the lipid peroxidation marker: malondialdehyde (MDA). SOD and Gpx activities were determined spectrophotometrically and expressed in international units per gram of hemoglobin (IU / g Hb). Vitamins E, A and MDA plasma concentrations were evaluated by reversed phase high performance liquid chromatography. The age mean was 32 ± 2 years in the young population and 50 ± 8 years in the older population. Gpx and SOD activities were comparable between groups: 46.9 ± 18.2 IU / g Hb versus 48.9 ± 26.6 IU / g Hb, $p = 0.798$ respectively for Gpx and 1112 ± 318 IU / g Hb versus 1111 ± 373 IU / g Hb, $p = 0.596$ respectively for SOD. There was no significant difference in vitamins E and A plasma concentrations between the young group and the elderly group. MDA plasma concentrations were significantly higher in elderly subjects compared to younger subjects: 10.7 ± 4.7 $\mu\text{g} / \text{l}$ versus 9.6 ± 6.3 $\mu\text{g} / \text{l}$, $p = 0.032$. There was no correlation between age and the different oxidative stress parameters studied. Our results are in favor of the absence of significant variations in Gpx and SOD enzymatic activities, and the vitamin E and A status during ageing. Moreover, an increase in lipid peroxidation is observed in favor of the installation of an oxidative stress state.

Key words: ageing, Oxidative stress, Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase, Vitamin E, Vitamin A.

INTRODUCTION ET OBJECTIF

Le vieillissement est un processus dynamique, progressif, irréversible et inéluctable. Il se caractérise par l'apparition de modifications morphologiques, biochimiques, fonctionnels et psychologiques dans l'organisme [1]. Le vieillissement des populations est en accélération rapide partout dans le monde. Selon l'OMS, la proportion des 60 ans et plus, dans la population mondiale, va presque doubler, entre 2015 et 2050, allant de 12% à 22% (900 millions- 2 milliard). L'Algérie n'échappe pas à ce phénomène, la proportion des 60 ans et plus était de 9% en 2015 et passera à 24% en 2050 [2].

Le vieillissement est corrélé à une augmentation de l'incidence de pathologies dégénératives (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies neuro-dégénératives); un fait ayant d'énormes répercussions sur la santé et les systèmes de santé publique.

De nombreuses théories ont été mises de l'avant pour expliquer ce phénomène complexe. On distingue deux grands types de théories : les théories déterministes et les théories stochastiques. Selon les premières, les mécanismes du vieillissement sont contrôlés par le génome. Les secondes attribuent un rôle prépondérant aux effets néfastes de l'environnement [2]. La théorie radicalaire ou stress oxydatif, proposée par Harman en 1956 et appartenant à ce dernier groupe, a reçu une attention considérable. Selon cette théorie, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les organismes aérobies induiraient un état de stress oxydatif provoquant des dommages oxydatifs sur les biomolécules qui, en s'accumulant, seraient responsables du vieillissement [3,4]. Cette hypothèse du stress oxydatif offre le meilleur mécanisme élucidant le processus de vieillissement et d'autres phénomènes tels que les pathologies dégénératives liées à l'âge [5].

Les ERO peuvent être des radicaux libres, porteurs d'un électron célibataire et donc très réactifs (par exemple, anion superoxyde et le radical hydroxyle), ou des espèces oxydantes non radicalaires (le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux, le peroxy-nitrite...). Elles sont le produit inéluctable de la vie aérobie et sont constamment produites [6,7].

Les mitochondries sont le siège majoritaire de production d'ERO, environ 2% à 3% de l'oxygène est transformé en radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale [8].

La production physiologique d'ERO est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense antioxydants [9,10], lesquels sont adaptatifs par rapport au niveau des radicaux présents [10]. Les systèmes antioxydants sont de deux types : enzymatiques (glutathion peroxydases GPx, superoxyde dismutase SOD, catalase...) et non enzymatiques (glutathion, les vitamines E, A et C ...) [6,11].

L'équilibre entre ces deux agonistes, oxydants et antioxydants, permet à certaines ERO de remplir leurs fonctions utiles (signalisation cellulaire, régulation du tonus vasculaire, immunité,...) tout en minimisant les dommages oxydatifs [12].

Le stress oxydatif est un déséquilibre de cette balance pro-oxydants/antioxydants qui provient d'une production excessive d'espèces réactives et / ou une défaillance des mécanismes antioxydants [13,14].

Depuis la théorie de Harman de nombreuses études ont été menées pour définir le rôle du stress oxydatif dans le vieillissement et les pathologies associées, cependant leurs résultats étaient controversés. A cet effet, nous avons mené cette étude afin d'étudier les variations du statut du stress oxydatif avec l'âge chez des sujets Constantinois présumés sains.

PATIENT ET MÉTHODES

1. Patients

Notre étude est de type transversal analytique, elle a eu lieu dans la ville de Constantine entre 2008 et 2012. Elle a porté sur une population de 185 volontaires présumés sains, âgés entre 25 et 75 ans. Les participants étaient répartis en fonction de leur âge en deux groupes : un groupe jeune (95 sujets âgés de moins de 40 ans) et un groupe âgés (90 sujets âgés de 40 ans et plus). Était exclus de l'étude, tout sujet souffrant d'affections aiguës ou recevant un traitement vitaminique antioxydant.

2. Méthodes

2.1. Fiche de renseignement

Les renseignements cliniques ont été récoltés sur la base d'une fiche de renseignements définissant : l'identité des participants, leurs paramètres anthropométriques et leurs habitudes de vie (tabagisme, prise d'alcool).

2.2. Prélèvements

Les prélèvements sanguins ont été effectués, après un jeûne de 12 heures, sur deux tubes héparinés: Le premier tube a servi au dosage de la glycémie, la créatinine et les paramètres du bilan lipidique et le deuxième tube hépariné a été destiné au dosage des paramètres du stress oxydatif : GPx, SOD, vitamines E, A et malondialdéhyde (MDA).

2.3. Méthodes de dosage

Dans notre étude, un bilan biochimique général (glucose, créatinine, cholestérol total, cholestérol HDL et cholestérol LDL) a été réalisé pour les deux groupes. Les marqueurs du stress oxydatif étudiés sont les activités enzymatiques des enzymes antioxydantes érythrocytaires la Gpx et la SOD, les concentrations plasmatiques des vitamines antioxydantes E et A ainsi que celles du MDA, marqueur de la peroxydation lipidique.

Tous les dosages ont été réalisés au niveau du laboratoire de biochimie CHU Benbadis.

2.4. Glycémie, bilans lipidique et rénal

La glycémie, les bilans lipidique et rénal ont été déterminés par dosages spectrophotométriques sur auto-analyseur Architect ci8200, Abbott. La glycémie était définie par la méthode enzymatique à l'hexokinase. La créatinine a été dosée par la réaction de Jaffé au picrate alcalin en cinétique. La méthode utilisée pour le dosage des triglycérides était la technique enzymatique colorimétrique en point final à la lipase, glycérokinase et glycérophosphate oxydase, selon la méthode de Fossati [15]. Le cholestérol total a été dosé par une méthode enzymatique colorimétrique en point final à la cholestérol estérase, cholestérol oxydase et peroxydase, selon la méthode d'Allain [16]. Le dosage du cholestérol HDL (C-HDL) a été réalisé par une méthode utilisant un accélérateur de réaction (permettant l'élimination du cholestérol non HDL) et un détergent spécifique (permettant la solubilisation du C-HDL).

Le cholestérol LDL (C-LDL) a été calculé par la formule de Friedwald [17]:

$$C-LDL (g/l) = Chol T - (C-HDL + Triglycérides/5).$$

3. Statut du stress oxydatif

L'évaluation des activités enzymatiques érythrocytaires de la Gpx et la SOD a été réalisée sur Dialab Autolyser. L'activité enzymatique de la SOD a été déterminée par la méthode enzymatique colorimétrique à la xanthine oxydase (le Kit Ransod,

Randox, Antrim, UK).

L'activité enzymatique de la GPx érythrocytaire a été évaluée par la méthode colorimétrique de Paglia et Valentine [18] utilisant l'hydroperoxyde de cumène comme substrat (le Kit Ransel, Randox, Antrim, UK).

Les résultats ont été exprimés en UI/g d'hémoglobine (UI/gHb). L'hémoglobine a été dosée sur sang total (pour la SOD) et sur globules rouge (pour la GPx) avec le réactif de Drabkin [19]. La lecture a été effectuée à 546 nm sur spectrophotomètre Biochrom Libra 522.

Le dosage des vitamines E et A a été réalisé par chromatographie haute performance (HPLC) en phase inverse après précipitation éthanolique et extraction hexanique. Le le nicotinate de tocophérol a servi d'étalon interne. La méthode de dosage utilisée résulte d'un compromis entre les méthodes précédemment publiées [20,21].

Les conditions chromatographiques étaient :

- colonne 4,5 × 120mm C18;
 - volume d'injection 20 µl;
 - phase mobile : méthanol 100 %;
 - débit 1,5 ml/min, temps de rétention 7 min;
 - détection UV à 292nm pour la Vit E et à 325nm pour la Vit A.
- La vitamine E a été exprimée par le ratio vitamine E/Cholestérol total (mg/g).

Le MDA a été dosé par HPLC en phase inverse après détection fluorimétrique, avec le Kit Malondialdéhyde de Chromsystems.

4. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSSv20. Les résultats descriptifs ont été présentés sous forme de pourcentages pour les variables qualitatives, de moyennes ± écart-types. Les comparaisons des différents paramètres entre les deux groupes ont été réalisées à l'aide des tests paramétriques (test de Khi-deux de Pearson ou de Fisher, test T de Student) et le test non paramétrique : test U de Mann-Whitney.

Les études de corrélations ont été réalisées avec le test du coefficient de corrélation des rangs de Spearman.

Le seuil de significativité retenu pour tous les tests statistiques était $p < 0,05$.

RÉSULTATS

L'âge moyen était de 32 ± 2 ans chez la population jeune et de 50 ± 8 ans chez la population âgée. La proportion du sexe féminin était significativement plus élevée chez le groupe âgé comparé au groupe jeune (tableau I).

Tableau I. Paramètres anthropométriques des groupes jeune et âgé.

	Groupe jeune	Groupe âgée	p
Age (ans)	32 ± 4	50 ± 8	<0,001
Sexe (♀/♂, %)	46/53,7	64,5/35,6	0,013
BMI (kg/m ²)	26,6 ± 5,1	29,1 ± 5	0,01
TT (cm)	93 ± 11	98 ± 14	0,01
TA systolique (mm Hg)	114 ± 11	123 ± 13	<0,001
TA diastolique (mm Hg)	68 ± 13	74 ± 16,1	0,006
Tabagisme (%)	28,5	11,1	0,03

TT: Tour de taille ; TA: Tension artérielle ; % : Pourcentage.

L'exploration biologique des participants a révélé des moyennes de glycémie, de cholestérol total, de cholestérol LDL triglycéridémie et de de cholestérol HDL significativement plus élevées, chez le groupe âgé comparé au groupe jeune (tableau II).

Tableau II. Glycémie, créatinémie et bilan lipidique des groupes jeune et âgé.

	Groupe jeune	Groupe âgée	p
Glycémie (g/l)	0,84 ± 0,1	0,91 ± 0,14	<0,001
Créatinine (mg/l)	7 ± 1	7 ± 1	0,813
Triglycérides (g/l)	1,21 ± 0,73	1,24 ± 0,63	0,824
Cholestérol (g/l)	1,64 ± 0,36	1,83 ± 0,36	<0,001
C- HDL (g/l)	0,38 ± 0,10	0,42 ± 0,10	0,01
C- LDL (g/l)	1,03 ± 0,27	1,16 ± 0,31	0,004

Les activités enzymatiques de la Gpx et SOD étaient comparables entre le groupe jeune et le groupe âgé: $49,9 \pm 18,2$ UI/g Hb versus $48,9 \pm 26,6$ UI/g Hb, $p = 0,798$; respectivement, pour la Gpx et 1112 ± 318 UI/g Hb versus 111 ± 373 UI/g Hb, $p = 0,596$; respectivement, pour la SOD. Il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes des ratios Vit E/Chol T ni les moyennes des concentrations plasmatiques de la vitamine A chez les sujets jeunes et ceux plus âgés. Elles étaient de $6,1 \pm 2,13$ mg/g versus $6,16 \pm 1,69$ mg/g, $p = 0,596$; respectivement pour le ratio Vit E/Chol T et $0,69 \pm 0,21$ mg versus $0,65 \pm 0,27$ mg, $p = 0,098$; respectivement, pour la vitamine A. Les concentrations plasmatiques du MDA étaient significativement plus élevées chez les sujets âgés comparés aux sujets jeunes : $10,7 \pm 4,7$ µg/l versus $9,6 \pm 6,3$ µg/l, $p = 0,032$ (tableau III). Il n'y avait pas de corrélation entre l'âge et les différents paramètres du stress oxydatif étudiés (tableau IV).

Tableau IV. Coefficients de corrélation de Spearman entre l'âge et les marqueurs du statut du stress oxydatif (Gpx, SOD, vit E/ Chol , vit A et MDA).

	Gpx	SOD	Vit E/Chol	Vit A	MDA
Rho	0,027	-0,053	0,103	0,079	0,103
p	0,729	0,508	0,171	0,294	0,175

Rho : Coefficients de corrélation de Spearman.

DISCUSSION

Le vieillissement est un processus multifactoriel dans lequel le stress oxydatif semble jouer un rôle prépondérant. La mise en évidence d'un état de stress oxydatif accru permet de développer des stratégies thérapeutiques et préventives. Sa me-

sure nécessite l'utilisation de marqueurs spécifiques, sensibles, reproductibles et fiables. Cependant, il n'existe pas de marqueur «gold standard» permettant l'évaluation du statut du stress oxydatif et le recours à un ensemble de biomarqueurs s'impose.

Dans notre étude, nous avons procédé à l'évaluation du statut du stress oxydatif en utilisant deux approches. La première approche est l'évaluation du système antioxydant par le biais de la détermination des activités enzymatiques de la Gpx et la SOD érythrocytaires ainsi que le dosage des concentrations plasmatiques des vitamines antioxydantes E et A. La deuxième approche est l'évaluation des dégâts générés par les ERO par le dosage plasmatique du MDA, marqueur de la peroxydation lipidique.

La SOD et la Gpx représentent les premières lignes de défenses antioxydantes. La SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène est métabolisé par la catalase [10,12,22,23]. La Gpx catalyse la réduction de l' H_2O_2 et les hydroperoxydes de lipides en H_2O et en alcools lipidiques respectivement, en une réaction utilisant le glutathion réduit (GSH) comme co-substrat [6,24]. Ces enzymes antioxydantes peuvent répondre à l'augmentation du stress oxydatif par une élévation de leurs activités enzymatiques ; une diminution des activités peut refléter une sensibilité des enzymes à l'inactivation induite par les radicaux libres. Cependant, il n'existe pas un consensus sur ce que pourrait être la réponse de des enzymes antioxydantes au stress oxydatif [25].

Dans notre étude les activités enzymatiques érythrocytaires de la Gpx et la SOD étaient comparables entre la population jeune et la population plus âgée. L'étude de corrélation n'a également pas trouvé de relation entre les activités de ces deux enzymes antioxydantes et l'âge. Les résultats de l'étude tunisienne de Sfar et al., 2009 [26] ne concordent pas avec les nôtres. Cette équipe a objectivé une diminution significative des activités enzymatiques de la Gpx et la SOD et des concentrations plasmatiques du Zinc (cofacteur de la SOD) chez la population âgée comparée à la population jeune. Les mêmes résultats ont été rapportés par l'équipe française de Guemouri concernant les activités enzymatiques de la Gpx et la SOD [27]. L'équipe de Sfar a également rapporté une corrélation négative entre les activités des enzymes antioxydantes étudiées, les taux plasmatiques de Zinc et l'âge. L'étude française de Mariani et al [28] a, par contre, révélé une corrélation positive significative entre l'activité enzymatique de la SOD et l'âge. Pavao et al (2003) [29], dans leur étude sur des sujets sains portugais, ont rapporté une absence de corrélation entre l'âge et l'activité enzymatique de la Gpx ; ce qui concorde avec nos résultats. Cependant, Bolzán et al [30] ont objectivé d'une part, une corrélation positive significative entre l'âge et l'activité enzymatique de la Gpx et d'autre part une corrélation inverse significative entre l'âge et l'activité enzymatique de la SOD.

Le contexte génétique, l'origine ethnique et les habitudes alimentaires peuvent influencer l'expression et les activités des enzymes antioxydantes. Ces facteurs peuvent être incriminés pour expliquer la divergence des résultats de notre étude avec ceux des études suscitées. L'hétérogénéité de la répartition des groupes en fonction de l'âge et la diversité des méthodes de dosage utilisées peuvent être également mises en cause.

Les chaînes d'acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation par les ERO [31,32,33]. Cette oxydation, appelée «peroxydation lipidique», est à l'origine de la formation de très nombreux produits (le MDA, le 4-hydroxynonénal [4-HNE] et les isoprostanes) dont les activités biologiques sont multiples [6,34]. Le MDA est le produit de la peroxydation lipidique le

plus étudié [1].

Dans notre étude, les concentrations plasmatiques du MDA étaient significativement plus élevées chez le groupe âgé comparé au groupe jeune. Nos résultats corroborent avec ceux de Vericel et al [35] qui ont objectivé, une augmentation significative de la teneur du MDA plaquettaire chez le groupe âgé comparé au groupe jeune. Cette même équipe a rapporté une diminution des taux plaquettaires de la vitamine E et de l'activité de la Gpx chez le groupe âgé comparé au groupe jeune. L'augmentation d'autres marqueurs de la peroxydation lipidique avec l'âge a été également rapporté ; il s'agit des isoprostanes urinaires (8-iso-PGF₂) [36] et des TBARs plasmatiques [22,37]. La peroxydation lipidique est à l'origine de la diminution de la fluidité des membranes [31,38], elle augmente leur perméabilité d'une part et inactive des enzymes et des récepteurs membranaires d'autre part [38]. Il est à noter que l'exposition à des concentrations élevées de produits de peroxydation lipidique entraîne une large gamme d'effets toxiques aigus [34]. Ils peuvent être à la fois mutagènes et cancérogènes, et joueraient un rôle dans le vieillissement et la progression des pathologies qui y sont inhérentes [39].

CONCLUSION

Nos résultats sont en faveur de l'absence de variations significatives des activités enzymatiques de la Gpx et SOD et du statut vitaminique E et A au cours du vieillissement. Par ailleurs une augmentation de la peroxydation lipidique est observée en faveur de l'installation d'un état de stress oxydatif avec l'âge.

Un statut antioxydant optimal de l'organisme jouerait un rôle important dans la lutte contre les effets néfastes du stress oxydatif liés à l'hyperproduction des radicaux libres avec l'âge et permettrait, donc, de prévenir les pathologies dégénératives associées au vieillissement (vieillesse en bonne santé).

Conflit d'intérêt

Aucun

RÉFÉRENCES

1. **Moreira PL, Villas Boas PJF, Ferreira ALA.** Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2014 Feb;60(1):75–83.
2. **Rapport mondial sur le vieillissement et la santé.** Organisation Mondiale de la santé; 2016.
3. **El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L.** Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Dec;65:380–401.
4. **Zhang H, Davies KJA, Forman HJ.** Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015 Nov;88, Part B:314–36.
5. **Gil del Valle L.** Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2011 Jan;1(1):1–7.
6. **Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J.** Radicaux libres et anti-oxydants. In: *Biochimie pathologique aspects moléculaires et cellulaires*. 2003. p. 59–81.
7. **Gardès-Albert M.** Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2006 Nov;64(6):365–72.
8. **Finkel T.** Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*. 2011 Jul 11;194(1):7–15.

9. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009 Aug;47(4):344–56.
10. Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2006 Nov;64(6):390–6.
11. Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2002 Dec;16(4):233–9.
12. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. 2007 Jul;74(7):636–43.
13. Favier A. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1997 Jan;55:9–16.
14. Edeas M, Attaf D, Mailfert A.S, Nasu M, Joubet R, Maillard. Reaction, mitochondria and oxidative stress: Potential role of antioxidants. *Pathologie Biologie*. 2010 Jun;58(3):220–5.
15. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982 Oct;28(10):2077–80.
16. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974 Apr;20(4):470–5.
17. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499–502.
18. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158–69.
19. Reuge C. Méthode standardisée pour le dosage de l'hémoglobine. *Revue Française de Transfusion*. 1968;11(1):45–50.
20. Garnière-Monteil C. Dosage du rétinol et de l'alpha tocophérol plasmatique par CLHP. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1994;52:547–53.
21. Jezequel-Cuer M, Le Moel G, Mounié J. Dosage de l'alpha-tocophérol sérique ou plasmatique par chromatographie haute performance: optimisation du mode opératoire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1995;53:343–52.
22. Goudable J, Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 1997 Jun;11(2):115–20.
23. Fontaine E, Barnoud D, Schwebel C, Leverve X. Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Antioxydants in critically ill patients*. *Réanimation*. 2002 Sep;11(6):411–20.
24. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009 Dec;47(12):1673–706.
25. Ho SP, Chan-Yeung M, Chow KKM, Ip MSM, Mak JCW. Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking. *Respirology*. 2005 Jun;10(3):305–9.
26. Sfar S, Jawed A, Braham H, Amor S, Laporte F, Kerkeni A. Zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Exp Gerontol*. 2009 Dec;44(12):812–7.
27. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*. 1991 Nov;37(11):1932–7.
28. Mariani E, Cornacchiola V, Polidori MC, Mangialasche F, Malavolta M, Cecchetti R, et al. Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status. *Biogerontology*. 2006 Oct 1;7(5–6):391–8.
29. Pavão M, Cordeiro C, Costa A, Raposo J, Santos M, Nève J, et al. Comparison of whole-blood glutathione peroxidase activity, levels of serum selenium, and lipid peroxidation in subjects from the fishing and rural communities of “Rabo de Peixe” village, San Miguel Island, the Azores’ Archipelago, Portugal. *Biol Trace Elem Res*. 2003 Apr;92(1):27–40.
30. Bolzán AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Human Blood: Influence of Sex, Age and Cigarette Smoking. *Clinical Biochemistry*. 1997 Aug;30(6):449–54.
31. Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol*. 2012;942:93–136.
32. Sang A, Baya G, Pamplona R, Leeuwenburgh C. Free radicals and Mammalian Aging. In: *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. p. 433–72.
33. Therond P. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2006 Nov;64(6):383–9.
34. Thomas R, Hurd P, Michael P. Biological Systems Relevant for Redox Signaling and Control. In: *Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine*. Weinheim: WILEY-VCH; 2009. p. 13–43.
35. Vericel E, Rey C, Calzada C, Haond P, Chapuy PH, Lagarde M. Age-related changes in arachidonic acid peroxidation and glutathione-peroxidase activity in human platelets. *Prostaglandins*. 1992 Jan;43(1):75–85.
36. Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D, Kačer P. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:562860.
37. Mendoza-Núñez VM, Ruiz-Ramos M, Sánchez-Rodríguez MA, Retana-Ugalde R, Muñoz-Sánchez JL. Aging-related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Nov;213(3):261–8.
38. Djordjević VB. Free Radicals in Cell Biology. In: *International Review of Cytology [Internet]*. Academic Press; 2004 [cited 2012 Sep 17]. p. 57–89. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769604370026>
39. Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2013 Mar;134(3–4):139–57.