



**HAL**  
open science

# Etude des variations de pressions partielles d'oxygène sur les réactions cellulaires chez le sujet sain

Clément Leveque

► **To cite this version:**

Clément Leveque. Etude des variations de pressions partielles d'oxygène sur les réactions cellulaires chez le sujet sain. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2024. Français. NNT : 2024BRES0040 . tel-04783824

**HAL Id: tel-04783824**

**<https://theses.hal.science/tel-04783824v1>**

Submitted on 14 Nov 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N° 637

*Sciences de la Vie et de la Santé*

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

**Clément LEVEQUE**

**Effet des variations de pressions partielles d'oxygène sur les réactions cellulaires chez le sujet sain.**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 28 Juin 2024

Unité de recherche : Préparée conjointement au laboratoire ORPHY (Brest) et au laboratoire de Physiologie environnementale et occupationnelle (Bruxelles)

## Rapporteurs avant soutenance :

Elsa HEYMAN HDR, Professeure, Faculté des Sciences du Sport et de l'Education Physique, Université de Lille  
Rodrigue PIGNEL MD, Chef du service de médecine hyperbare, Hôpital Universitaire de Genève

## Composition du Jury :

Président :	Elsa HEYMAN	HDR, Professeure, Faculté des Sciences du Sport et de l'Education Physique, Université de Lille
Examineurs :	Jean Éric BLATTEAU	MD, PhD, Hôpital d'Instruction des armées Sainte Anne (Toulon)
	Elsa HEYMAN	HDR, Professeure, Faculté des Sciences du Sport et de l'Education Physique, Université de Lille
	Rodrigue PIGNEL	MD, Chef du service de médecine hyperbare, Hôpital Universitaire de Genève
	Michael THERON	PhD, HDR, Professeur, Faculté des sciences du sport et de l'éducation, Université de Bretagne Occidentale.
Dir. de thèse :	François GUERRERO	PhD, HDR, Professeur, Faculté des sciences du sport et d l'éducation, Université de Bretagne Occidentale.
Co-dir. de thèse :	Costantino BALESTRA	PhD, Professeur, Université Libre de Bruxelles (ULB), Bruxelles.

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information ».*

*Albert Einstein*

# Remerciements :

*Ce manuscrit marque le commencement d'une nouvelle étape de ma vie, et je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce parcours. Leur soutien et leurs conseils ont été essentiels pour mener à bien ce travail.*

*Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude envers mon directeur de thèse, le Professeur Costantino Balestra, pour sa guidance experte, son soutien constant et ses conseils précieux tout au long de cette recherche. Sa patience, son dévouement et son expertise ont été des éléments fondamentaux dans la réalisation de ce travail. Je le remercie d'avoir cru en moi durant les moments de doute et d'être non seulement mon mentor, mais aussi un ami. Ses leçons de vie ont enrichi ce parcours, démontrant que la physiologie conduit à bien des enseignements.*

*Je suis également reconnaissant envers le Professeur François Guerrero pour m'avoir accompagné malgré la distance et l'incertitude. Ses conseils bienveillants ont permis d'accomplir ce travail de manière sereine.*

*Mes sincères remerciements vont à tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de recherche et pour leurs précieuses suggestions qui ont enrichi cette thèse.*

*Je tiens également à remercier mes collègues de l'Institut Supérieur d'Ergothérapie et de Kinésithérapie (ISEK) pour leur partage d'idées et leur soutien constant tout au long de cette aventure académique, en particulier le Docteur Sigrid Theunissen pour son accompagnement continu dans mes travaux et ses relectures précieuses, ainsi que le Docteur Kate Lambrechts sans qui ce travail n'aurait pas été possible.*

*Vive reconnaissance à nos collègues Docteur Simona Mrakic Sposta et Docteur Alessandra Vezzoli, pour la minutie de leur travail et leur chaleureux accueil à Milan.*

*Je remercie chaleureusement Professeure Elsa Heyman ainsi que le Docteur Rodrigue Pignel pour avoir eu la gentillesse d'accepter de rapporter ce travail.*

*Enfin, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers les membres de ma famille, mes sœurs, Nathalie et Marlène, ainsi que mes parents, Pierre et Chantal LEVEQUE pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements constants et leur amour qui ont été les piliers de ma réussite académique. Merci de m'avoir accompagné dans ma réalisation.*

*Permettez-moi également de dédier ce mémoire à mes proches et amis, Mario Sage et Daniel Leclercq, dont les rencontres ont été indispensables à ma réalisation.*

*Ma dernière pensée sera pour Rita De Weerd, merci pour ta présence et ta bienveillance depuis toutes ces années. Merci de m'avoir accompagné avec amour.*

## TABLE DES MATIERES

<b>Table des figures .....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des publications .....</b>	<b>7</b>
Publications et Communication en rapport avec la thèse .....	7
Publications .....	7
Autres Publications.....	7
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>8</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
Cadre conceptuel .....	9
Histoire de l'oxygène.....	9
Le métabolisme RedOx.....	12
Vue générale .....	12
Source et élimination .....	13
Le peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	14
La signalisation cellulaire est finement réglée par la régulation redox .....	16
Le facteur de transcription nucléaire κB (NFκB) .....	17
Le facteur inductible par l'hypoxie 1α (HIF1-α) .....	18
L'OxInflammation .....	19
L'inflammation, une réponse biologique .....	20
Les mécanismes de la réponse inflammatoire.....	20
La voie du NF-κB.....	22
La voie des MAPK .....	23
La voie JAK-STAT.....	24
Les marqueurs inflammatoires .....	25
Les cytokines inflammatoires.....	25
Les protéines et enzymes inflammatoires .....	26
Les autres marqueurs inflammatoires .....	26
Les types de cellules dans les réponses inflammatoires.....	26
La résolution de l'inflammation .....	27
L' Interleukine 6.....	28
L'oxygène comme stimulus d'information.....	30
Le « Normobaric oxygen paradox » (NOP).....	30
Du NOP au DeltOx : Objectif de la thèse.....	34

<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>36</b>
Protocole expérimental.....	36
Groupe hypoxie normobare (Mhypo 15% O <sub>2</sub> & Ehypo 10%) .....	38
Groupe hyperoxie normobare (Mhyper 30% & Ehyper 100%) .....	38
Groupe Hyperoxie Hyperbare (MHyper 140% & EHyper 250%).....	38
Analyse des échantillons sanguins .....	39
Détermination des ROS par résonance paramagnétique électronique (RPE) .....	39
Capacité anti-oxydante totale.....	40
Superoxide Dismutase (SOD) et Catalase (CAT).....	40
Analyse des échantillons d'urine.....	41
Métabolites de l'oxyde nitrique (NO <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> ) .....	41
8-Isoprostane (8-Iso-PGF <sub>2</sub> α) .....	41
Interleukine-6.....	41
Concentrations de créatinine, de néoptérine et d'acide urique.....	41
Échelle visuelle analogique (EVA) .....	42
Analyse statistique .....	42
Hypoxie normobare.....	42
Hyperoxie normobare .....	42
Hyperoxie hyperbare.....	43
<b>Résultats</b> .....	<b>44</b>
Cinétique de réponse au stress oxydant après 60 minutes à différents niveaux (10 % ou 15 %) d'exposition à l'hypoxie normobare.....	44
Cinétique de la réponse au stress oxydant après 60 minutes d'exposition à des hyperoxies normobares différentes (30% ou 100%). .....	59
Cinétique de la réponse au stress oxydant après 60 minutes d'expositions à l'hyperoxie hyperbare à différentes pressions (1,4 ATA et 2,5 ATA).....	73
<b>Discussion générale</b> .....	<b>88</b>
Effet du stimulus hypoxique.....	89
Effet du stimulus hyperoxique .....	91
<b>Conclusion</b> .....	<b>100</b>

# Table des figures

Figure 1 : Processus de phosphorylation oxydative et équilibre du stress oxydant [5].	10
Figure 2 : La double face des thérapies à l'oxygène.	11
Figure 3 : Modélisation en système complexe de la voie du stress oxydant et les contres mesures disponibles.	13
Figure 4 : Plages estimées de concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ce qui concerne les réponses cellulaires : eustress oxydatif et détresse oxydative.	15
Figure 5 : Voie du NRF2 dépendant de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [52].	16
Figure 6 : Voie du NF-κB dépendant du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	17
Figure 7 : Voie du HIF1a dépendant du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	18
Figure 8 : Signalisation TLR.	21
Figure 9 : Voie inflammatoire du NF-κB.	22
Figure 10 : Voie inflammatoire du MAPK.	23
Figure 11 : Voie inflammatoire JAK-STAT.	24
Figure 12 : Les effets pléiotropes de l'IL-6.	28
Figure 13 : Choix d'impacts de l'IL-6 sur divers systèmes organiques dans l'ensemble du corps.	29
Figure 14 : Mécanisme du Normobaric Oxygen Paradox (NOP):	33
Figure 15 : Niveaux d'oxygène et leur utilisation thérapeutique	34
Figure 16 : Organisation du protocole DeltOx.	36
Figure 17. Flowchart expérimentale.	37
Figure 18 : Variations en pourcentage des MP (Monocytes/Macrophages) après 60 minutes de respiration à l'oxygène.	89
Figure 19 Chimie biologique du peroxy-nitrite (adapté de Lucas Liaudet)	90
Figure 20 : Cinétique de l'expression des ROS en fonction de la FiO <sub>2</sub> :	92
Figure 21 : Cinétique de l'expression de la catalase en fonction de la FiO <sub>2</sub> :	94
Figure 22 Cinétique de l'expression de la SOD en fonction de la FiO <sub>2</sub> :	95
Figure 23 : Normobaric oxygen paradox (NOP) et réponses cellulaires :	96
Figure 24 : Cinétique de l'expression de l'IL-6 en fonction de la FiO <sub>2</sub> :	97
Figure 25 : Cinétique de l'expression de la néoptérine en fonction de la FiO <sub>2</sub> :	98
Figure 26 Concept DeltOx : Effet de l'hyperoxie aigue à différentes pressions partielles d'oxygène.	99

# Liste des publications

## Publications et Communication en rapport avec la thèse

### Publications

**Leveque, C.;** Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Gussoni, M.; Levenez, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different Levels (10% or 15%) of Normobaric Hypoxia Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10188.

**Leveque, C.;** Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Bosco, G.; Lévénéz, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different (1.4 ATA and 2.5 ATA) Hyperbaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12361.

**Leveque, C.;** Mrakic-Sposta, S.; Lafère, P.; Vezzoli, A.; Germonpré, P.; Beer, A.; Mievis, S.; Virgili, F.; Lambrechts, K.; Theunissen, S.; et al. Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 664.

Balestra, C.; Arya, A.K.; **Leveque, C.;** Virgili, F.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Lafère, P.; Thom, S.R. Varying Oxygen Partial Pressure Elicits Blood-Borne Microparticles Expressing Different Cell-Specific Proteins—Toward a Targeted Use of Oxygen? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7888.

### Autres Publications

Balestra C, **Leveque C**, Mrakic-Sposta S, Vezzoli A, Wauthy P, Germonpré P, Tillmans F, Guerrero F, Lafère P. Physiology of deep closed circuit rebreather mixed gas diving: vascular gas emboli and biological changes during a week-long liveaboard safari. *Front Physiol.* 2024 Apr 10;15:1395846.

Lévénéz, M.; Moeremans, M.; Booghs, C.; Vigouroux, F.; **Leveque, C.;** Hemelryck, W.; Balestra, C. Architectural and Mechanical Changes after Five Weeks of Intermittent Static Stretch Training on the Medial Gastrocnemius Muscle of Active Adults. *Sports* **2023**, *11*, 73.



# Liste des abréviations

$^1\text{O}_2$  : Oxygène singulet  
8-OHdG : 8-hydroxy-2-désoxyguanosine  
ADP : Adénosine diphosphate  
ATA : Atmosphäre, Technische, Absolut  
ATP : Adénosine Triphosphates  
CAT : Catalase  
DAMP: Damage Associated Molecular Pattern  
EPO : Erythropoïétine  
ERK1/2 : Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2  
FAD : flavine adénine dinucléotide  
FIH : Factor Inhibiting HIF  
GPX : Glutathion peroxydase  
GR : Glutathion réductase  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  : Peroxyde d'hydrogène  
HIF1- $\alpha$  : Hypoxia Inducible factor  
IL-6 : Interleukine 6  
iNOS : Oxyde Nitrique Synthase  
I $\kappa$ B : I $\kappa$ B kinase  
JNK : c-Jun N-terminales Kinases  
KEAP 1: Kelch-like ECH-associated protein 1  
MA : Maladie d' Alzheimer  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
MDA : Malondialdéhyde  
MPO : Myéloperoxydase

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B  
NO: Monoxyde d'azote  
NOP : Normobaric Oxygen Paradox  
NOX : NAPH Oxydase  
NRF-2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
 $\text{O}_2^{\bullet-}$  : Anion superoxyde  
OH $\cdot$  : Oxygène Hyperbare  
p50 : Nuclear factor-kappaB  
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern  
PHD2 : Prolyl hydroxylase domain-2  
PRR: Pattern recognition receptor  
Prx : Peroxirédoxine  
RNS : Reactive Nitrogen Species  
ROS :Reactive Oxygen Species (Espèce réactives de l'oxygène)  
SOD : Superoxyde dismutase  
TLR: Toll-like receptor  
TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factors  
TRIF : TIR-domain-containing adaptor-inducing beta interferon  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

# Introduction

## Cadre conceptuel

### Histoire de l'oxygène

L'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) est l'un des éléments les plus importants sur Terre, en particulier pour les organismes aérobies qui en dépendent pour libérer l'énergie des molécules à base de carbone. La concentration d'oxygène dans l'atmosphère est de 20,93 à 20,95 % [1], mais cela a nettement fluctué tout au long de l'histoire[2]. Bien que la Terre ait 4,5 milliards d'années, son atmosphère primitive ne contenait pratiquement aucun  $O_2$ . Cependant, au fil du temps, l'oxygène est devenu la principale source d'énergie produite par les cellules non photosynthétiques, par phosphorylation oxydative mitochondriale. Un équilibre variable dans la gamme habitable s'est établi et s'est maintenu depuis le début du Cambrien, il y a 540 millions d'années. Chaque augmentation de la concentration d'oxygène dans l'atmosphère s'accompagnait d'une explosion de vie nouvelle, mais les baisses sont associées à la diminution et à l'extinction des espèces. L'oscillation de la concentration d'oxygène atmosphérique autour d'un niveau qui favorise de manière optimale le développement d'organismes multicellulaires est appelée le cycle global de l'oxygène[3].

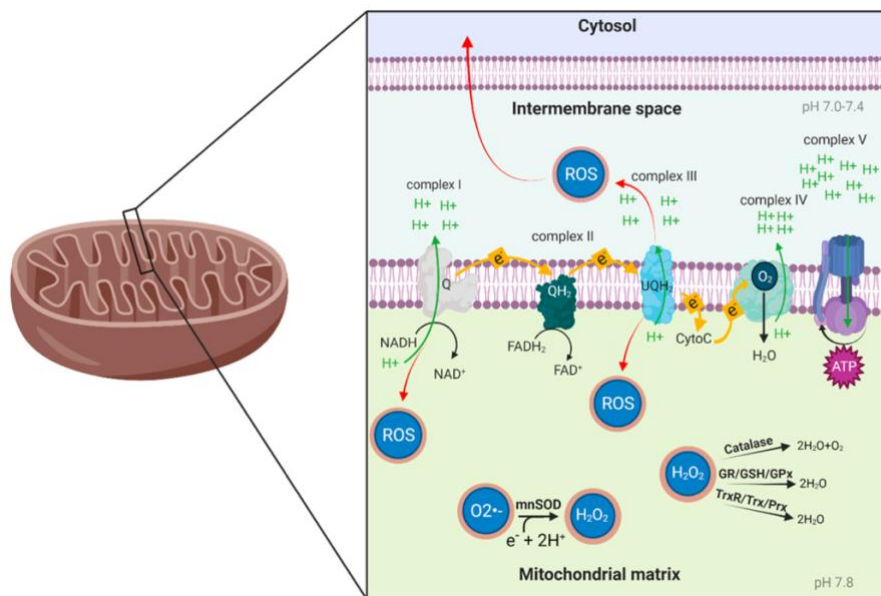
L'histoire de l'oxygène remonte à environ 3,5 milliards d'années, lorsque les premières formes de vie photosynthétiques ont commencé à produire de l'oxygène par photosynthèse. Pendant des milliards d'années, l'oxygène produit par ces organismes était principalement consommé par les réactions chimiques avec les roches et les minéraux terrestres, ce qui signifie que l'atmosphère de la Terre ne contenait presque pas d'oxygène libre. Il y a environ 2,4 milliards d'années, cependant, des cyanobactéries, également connues sous le nom de « bactéries bleues », ont commencé à produire de l'oxygène par photosynthèse à des niveaux élevés. Cela a commencé à changer la composition de l'atmosphère terrestre, augmentant lentement la concentration d'oxygène. Cette période, appelée la grande oxydation, a eu un impact considérable sur l'évolution de la vie sur Terre, permettant l'émergence de nouvelles formes de vie qui ont évolué en utilisant l'oxygène pour produire de l'énergie.

Au fil du temps, la concentration d'oxygène dans l'atmosphère est restée relativement stable, oscillant entre environ 15 % et 35 %. Cette plage de concentration d'oxygène est importante pour la survie de la vie sur Terre car des concentrations plus élevées pourraient être toxiques à de nombreux organismes, tandis que des concentrations plus faibles ne seraient pas suffisantes pour soutenir la vie aérobie. En somme, l'histoire de l'oxygène est intimement liée à l'histoire de la vie sur Terre. L'oxygène a joué un rôle déterminant dans l'évolution de la vie, permettant l'émergence de nouvelles formes de vie et modifiant la composition de l'atmosphère terrestre.

L'oxygène est un accepteur d'électrons idéal en raison de son potentiel d'oxydoréduction élevé, ce qui en fait un puits pour la capture d'énergie intracellulaire. Toutefois, sa réactivité peut également causer des dommages intracellulaires en arrachant des électrons des macromolécules biologiques. Cela peut entraîner une toxicité de l' $O_2$ , qui est due aux espèces intermédiaires réactives de l'oxygène (ROS) qui ne sont normalement

éliminées que par des systèmes antioxydants cellulaires. Bien que nous comprenions depuis longtemps le rôle de l'O<sub>2</sub> dans la respiration et les mécanismes de défense de la cellule contre ses effets toxiques, nous sommes maintenant en train de découvrir comment l'O<sub>2</sub> et les ROS agissent en tant que mécanismes de transduction de signal cellulaire pour maintenir l'homéostasie et s'adapter au stress cellulaire.

Environ 90 à 95 % de l'oxygène (O<sub>2</sub>) consommé par l'organisme est utilisé par les mitochondries pour produire de l'énergie cellulaire grâce à la respiration et à la phosphorylation oxydative [4]. La phosphorylation oxydative permet de conserver l'énergie provenant de la dégradation des substrats carbonés présents dans les aliments que nous consommons, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), celui-ci est essentiel au fonctionnement cellulaire. Afin de générer de l'ATP par respiration aérobie, l'O<sub>2</sub> est réduit en eau au cours d'un processus à quatre électrons sans production de ROS. L'ATP est ensuite hydrolysé en adénosine diphosphate (ADP) fournissant de l'énergie pour effectuer des fonctions cellulaires de base, telles que le maintien des gradients ioniques, l'ouverture des canaux ioniques pour la conduction nerveuse, la contraction musculaire, ainsi que la croissance, la réparation et la prolifération cellulaire.



**Figure 1 : Processus de phosphorylation oxydative et équilibre du stress oxydant [5].**

Le NADH, un produit du cycle de l'acide citrique, est oxydé en NAD<sup>+</sup> au complexe I, transférant un électron en ubiquinone (Q). Au complexe II, le FADH<sub>2</sub> est oxydé en FAD<sup>+</sup>, transférant un autre électron à Q. Lorsque Q arrive au complexe III, il transfère ses électrons au cytochrome C (CytoC). Au complexe IV, les électrons transportés par CytoC sont attirés en oxygène diatomique (O<sub>2</sub>) et, avec l'hydrogène, ils forment de l'eau (H<sub>2</sub>O). Dans le processus de la chaîne de transport d'électrons, les complexes I, III et IV pompent les protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant un gradient de protons électrochimique et un potentiel membranaire (Δψ) sur la membrane interne des mitochondries. Le complexe V (ATP synthase) utilise le gradient de protons pour permettre aux protons de revenir dans la matrice mitochondriale, synthétisant l'ATP. Les complexes I et III sont les principaux sites de production de radicaux libres ; s'ils libèrent du superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) dans la matrice mitochondriale, superoxyde dismutase dépendant du manganèse (mnSOD) le transformera en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensuite, en fonction de la spécificité de la cellule, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sera transformé en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O par catalase, ou en H<sub>2</sub>O par la glutathion réductase/glutathion peroxydase (GR/GPx) ou thiorédoxine réductase/péroxyrédoxine (TrxR/Prx), en présence de produits respiratoires (comme le NADPH).

L'énergie sous forme d'ATP est dérivée de l'oxydation des glucides, lipides et protéines alimentaires. La proportion de glucides, lipides et protéines utilisés pour produire de l'ATP est spécifique à chaque cellule et chaque organe. Par exemple, les cellules cérébrales adultes (en condition physiologique) et les érythrocytes utilisent des glucides, tandis que l'énergie nécessaire à la contraction cardiaque provient principalement de l'oxydation des acides gras [6-8]. Bien que l'O<sub>2</sub> soit nécessaire pour la génération d'ATP aérobie, des ROS peuvent être produits en tant que sous-produit du transfert non spécifique d'électrons vers l'O<sub>2</sub> par des protéines de transport d'électrons mitochondriales ou par des réactions extra mitochondriales non enzymatiques[9]. De plus, de nombreuses enzymes endogènes produisant des ROS utilisent l'O<sub>2</sub> moléculaire pour leurs réactions. La production de ROS par certains mécanismes normaux et la plupart des mécanismes pathologiques augmente en fonction de la concentration d'oxygène dans le tissu, ce qui peut entraîner à la fois des dommages moléculaires directs et une interférence avec les événements régulateurs redox essentiels comme décrit plus tard. Une représentation graphique de l'utilisation de l'O<sub>2</sub> moléculaire par ces systèmes enzymatiques et les conséquences en aval - bonnes et mauvaises - est présentée dans la figure 2.

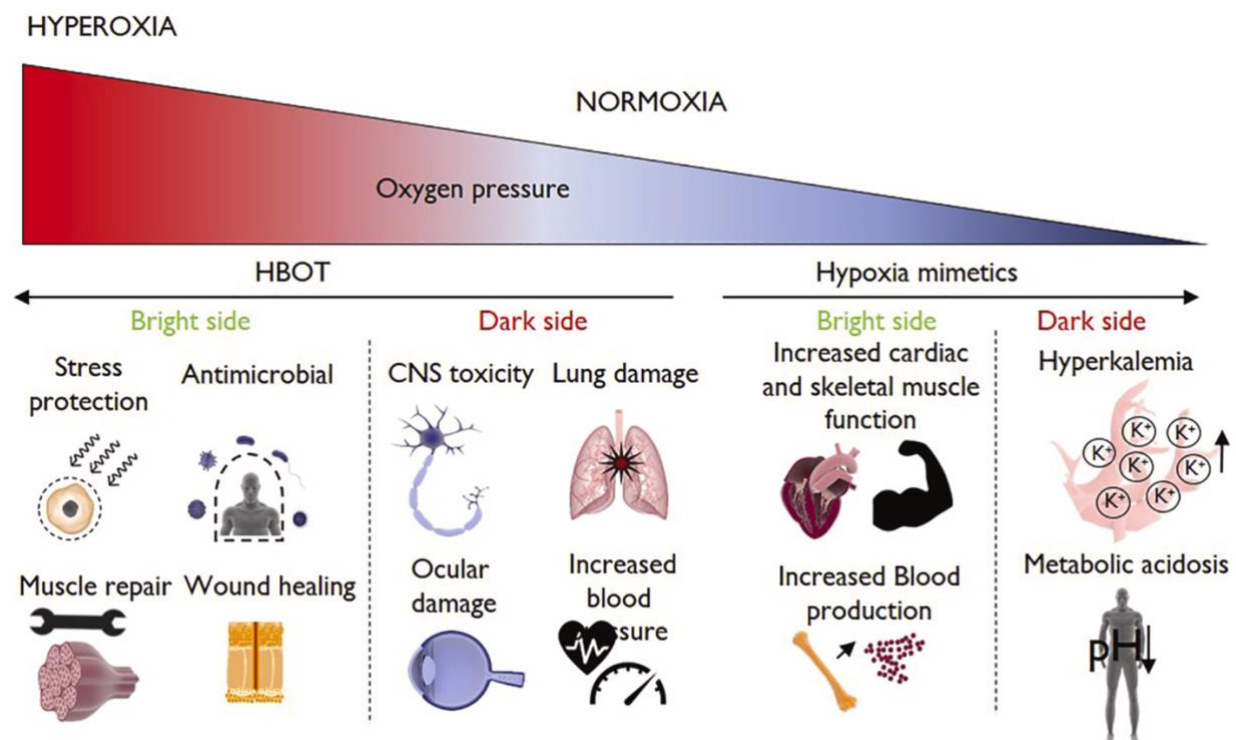


Figure 2 : La double face des thérapies à l'oxygène.

Les thérapies ciblant les voies associées à l'oxygène de l'hypoxie à application l'oxygène hyperbare (OHB) sont utilisées pour traiter des pathologies chroniques telles que les maladies pulmonaires et l'anémie. Des effets à la fois bénéfiques et néfastes ont été identifiés pour les deux options de traitement [10].

Des systèmes complexes ont évolué pour permettre une production continue d'ATP tout en minimisant la production de ROS par le métabolisme normal, car l'O<sub>2</sub> et ses intermédiaires sont très réactifs. Les protéines des complexes respiratoires, par exemple, ne permettent qu'à 1 à 2 % de l'O<sub>2</sub> consommé par le système de transport des électrons mitochondriaux de générer des ROS. Cette séquence de réactions d'oxydation-réduction génère un flux d'électrons à travers les complexes I à IV du système de transport des électrons. Ceci produit une force électromotrice à travers la membrane mitochondriale interne médiée par l'ATPase, également connue sous le nom de complexe V, pour synthétiser de l'ATP. Au cours de ce processus, de petites quantités d'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) et d'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) sont produites principalement au niveau des complexes I et III en proportion de la concentration d'O<sub>2</sub> locale et de l'état de réduction du transporteur. Bien que de tels ROS puissent clairement endommager les mitochondries et les organites adjacents en oxydant l'ADN, les protéines et les lipides, ou en favorisant la formation d'adduits avec l'ADN, les mitochondries sont protégées par la superoxyde dismutase (SOD2) et leurs propres systèmes de glutathion peroxydase. La petite quantité de l'O<sub>2</sub><sup>•</sup> que les mitochondries produisent est rapidement convertie en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dont une partie s'échappe dans le cytoplasme et participe à la transduction du signal intracellulaire. En fait, la majorité de la recherche sur la signalisation cellulaire induite par les ROS s'est concentrée sur les changements catalytiques induits par l'oxydation des protéines de signalisation cellulaire par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[11].

## Le métabolisme RedOx

### *Vue générale*

Le "stress oxydatif" est un concept global; il a été défini comme "un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou des dommages moléculaires"[12]. Cette définition prend en compte les avancées significatives en biologie redox qui ont permis de comprendre le rôle de la signalisation redox [13-17].

Les oxydants, en tant que messagers secondaires, ont été mis en évidence par de nombreuses études. La signalisation redox, dénommée eustress oxydatif, est indispensable pour réguler les processus vitaux en utilisant une quantité physiologique restreinte d'oxydants. Cependant, un excès d'oxydants qui se répand dans des zones non spécifiques peut entraîner des dégâts aux biomolécules, ce qui constitue la détresse oxydative[12, 18].

Pour assurer une régulation efficace de la fonction cellulaire, il est crucial de maintenir un équilibre redox physiologique[13, 19-21]. Ce mécanisme ubiquitaire est impliqué dans divers processus physiologiques comme la formation de matrices extracellulaires, la cicatrisation des plaies et l'immunité[22-24].

### Source et élimination

Les ROS cellulaires proviennent de diverses sources, leur production et leur élimination sont rigoureusement régulées pour les maintenir à des niveaux physiologiques. Les principaux ROS d'importance physiologique sont le radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui sont générés séquentiellement. L'  $O_2^{\bullet-}$  est produit par des enzymes spécifiques telles que les NOX [25] ou par les complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale en réduisant l' $O_2$  par un seul électron. Chez l'homme, plus de 40 enzymes génératrices d' $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$  ont été identifiées [26].

Bien que l' $O_2^{\bullet-}$  soit produit dans divers organites, ses niveaux stables sont généralement bas en raison de sa dismutation spontanée et/ou enzymatique en  $H_2O_2$ , catalysée par les superoxydes dismutases (SOD1- SOD2 - SOD3) [27]. Les SOD1 et SOD3 dépendent du cuivre et du zinc (CuZn) et se trouvent respectivement dans le cytosol et à l'extérieur de la cellule, tandis que la SOD2 dépendant du manganèse (Mn) est située dans la matrice mitochondriale. Comparé à l'  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  présente une réactivité globale plus faible, car non radicalaire et plus stable. Cependant, il présente une forte sélectivité pour les groupes thiol des résidus cystéine. Par ailleurs, parmi les différents types de ROS,  $H_2O_2$  peut traverser les membranes par diffusion passive ou par transport facilité via des canaux, tels que les aquaporines[28, 29].

La production directe de  $H_2O_2$  peut provenir d'enzymes telles que NOX4, les monoamines oxydases et les xanthines oxydases[30, 31]. Cependant, afin de prévenir les dommages cellulaires permanent l' $H_2O_2$  doit être catabolisé. La décomposition de  $H_2O_2$  est catalysée par la catalase dépendante de l'hème, la glutathion peroxydase dépendante du sélénium (GPx) [32] et la peroxyrédoxine (Prx) [33] contenant des thiols[34-36].

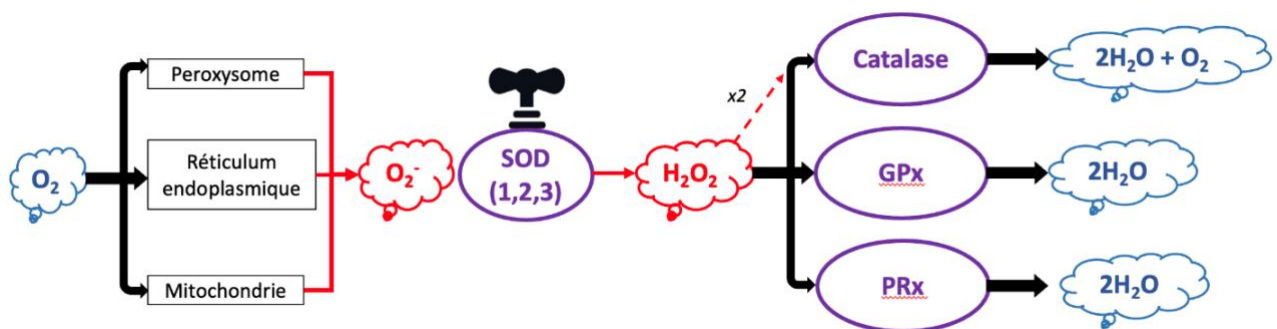


Figure 3 : Modélisation en système complexe de la voie du stress oxydant et les contre-mesures disponibles.

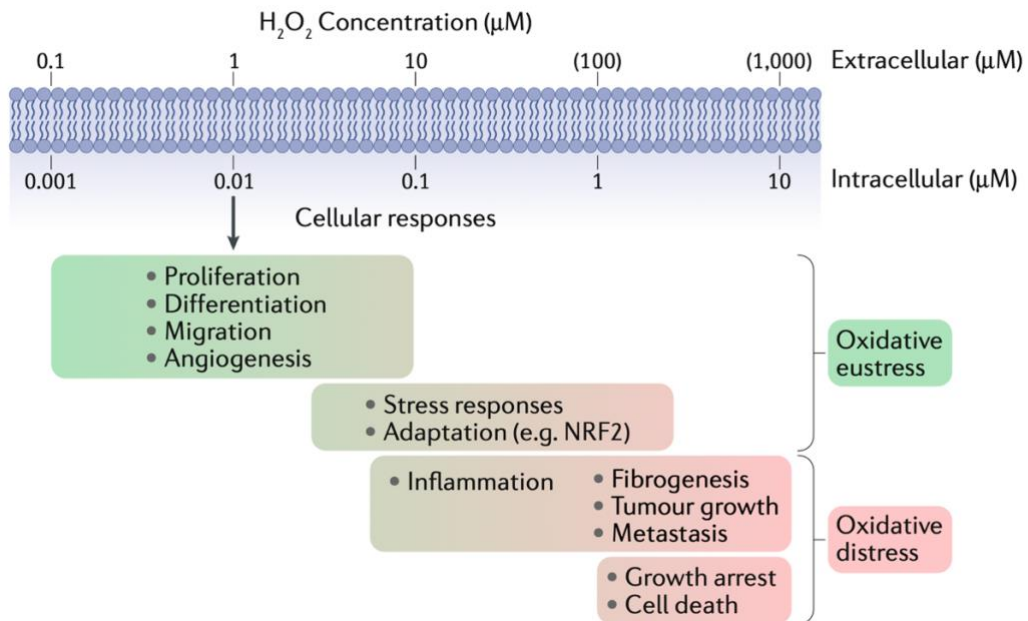
## Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est considéré comme le principal ROS impliqué dans la régulation redox des activités biologiques. Tout comme le calcium (Ca<sup>2+</sup>)[37], il s'agit d'un agent polyvalent pléiotrope de signalisation physiologique. Depuis plus de 50 ans, il est connu que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est produit physiologiquement en faible quantité dans les cellules eucaryotes afin de maintenir une homéostasie cellulaire[38]. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est généré dans la gamme nanomolaire basse (environ 1 à 100 nM) et sous contrôle strict en réponse à des signaux métaboliques ou à divers facteurs de stress tels que des facteurs de croissance, des chimiokines, des facteurs de stress physiques ou encore l'oxygène[39]. Lorsqu'il est produit dans ces conditions, il peut avoir un impact significatif dans la régulation des processus biologiques en modifiant l'activité, la localisation et les interactions des protéines cibles spécifiques. Cependant, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est éliminé de manière efficace par des systèmes réducteurs afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et éviter les effets potentiellement nocifs de l'oxydation excessive. Cela conduit à une oxydation réversible, ce qui modifie l'activité, la localisation et les interactions des protéines. Cette oxydation est impliquée dans divers processus biochimiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et l'angiogenèse[40]. Cet état de bas niveau de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui maintient les signalisations physiologiques redox est appelé "eustress oxydatif"[18, 41].

Les signaux oxydants peuvent atteindre leur cible ultime de manière directe ou indirecte via un relais redox qui permet une signalisation précise et spécifique. Les cibles physiologiques des oxydants agissent comme des commutateurs redox moléculaires dans la réponse aux stress ou aux perturbations externes. Les oxydants ont une influence majeure en tant qu'agents de signalisation, car des niveaux modérément élevés d'oxydants mitochondriaux ont été observés pour améliorer la défense systémique et favoriser la santé et la longévité, un concept appelé « mitohormèse »[42, 43]. Ce concept est une extension du terme plus large 'hormésis'[44], qui est impliqué dans l'homéostasie redox.

Contrairement aux niveaux physiologiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui sont importants pour la signalisation, une concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supérieure à la normale (estimée à plus de 100 nM) peut causer une oxydation non spécifique des protéines. Cette oxydation peut entraîner des dommages réversibles et irréversibles aux biomolécules, perturbant ainsi l'homéostasie cellulaire et conduisant finalement à l'apoptose. Ce déséquilibre oxydatif est communément appelé "stress oxydant".

La détresse oxydative peut causer des dommages à toutes les classes de macromolécules, affectant ainsi leur fonctionnement. En outre, les produits de ces dommages peuvent agir comme des signaux oxydants secondaires, tels que la 4-hydroxynonéal et d'autres aldéhydes réactifs générés lors de la peroxydation lipidique qui peuvent réagir avec des protéines. Une variété de produits d'oxydation des protéines ont été identifiés, et les réponses biologiques associées ont été caractérisées. Les dommages oxydatifs à l'ADN ont également été largement étudiés dans le contexte de la mutagenèse et du développement du cancer, de la méthylation de l'ADN et de la structure de la chromatine. Bien que les preuves s'accumulent également pour les dommages oxydatifs à l'ARN, l'impact fonctionnel potentiel n'a pas encore été entièrement élucidé.



**Figure 4 : Plages estimées de concentration de  $H_2O_2$  en ce qui concerne les réponses cellulaires : eustress oxydatif et détresse oxydative.**

La plage physiologique intracellulaire s'étend jusqu'à environ 100 nM. Les réponses au stress et l'adaptation se produisent à des concentrations plus élevées. Une exposition encore plus élevée entraîne une réponse inflammatoire, un arrêt de la croissance et la mort cellulaire par divers mécanismes. Les colorations verte et rouge dénotent respectivement des réponses principalement bénéfiques (eustress) ou délétères (détresse). Un gradient de concentration estimé de 100 fois de l'extracellulaire à l'intracellulaire est donné à titre d'orientation approximative ; ce serait 500 fois plus élevé si l'on considère une concentration de  $H_2O_2$  de 5  $\mu M$  dans le plasma sanguin [45]. L'exposition expérimentale élevée au  $H_2O_2$  extracellulaire est indiquée entre parenthèses. Le gradient varie en fonction du type de cellule, de l'emplacement à l'intérieur des cellules et de l'activité des puits enzymatiques [26].



## La signalisation cellulaire est finement réglée par la régulation redox

La régulation redox des facteurs de transcription (TFs) est au cœur du contrôle des réponses cellulaires. Plusieurs mécanismes permettent de réguler ces TFs en réponse aux changements dans l'équilibre redox de la cellule.

### Le système NRF2-KEAP1

Le système NRF2-KEAP1 Nuclear factor ((erythroid-derived 2)-like 2) représente le modèle d'un mécanisme physiologique capteur-effecteur basé sur les thiols, réagissant aux défis oxydants et contribuant au maintien de l'homéostasie redox chez les eucaryotes[46, 47]. Lorsque les niveaux de ROS augmentent, l'oxydation de KEAP1 induit une modification de sa configuration, ce qui permet la libération de NRF2 pour sa translocation dans le noyau cellulaire. NRF2 active ensuite des gènes impliqués dans la régulation du stress oxydatif et la production de cofacteurs pour les réactions redox[48, 49]. La complexité de cette régulation basée sur les thiols est démontrée par les nombreux groupes thiols de cystéine présents dans KEAP1, qui réagissent de manière sélective aux divers oxydants[47, 50, 51].

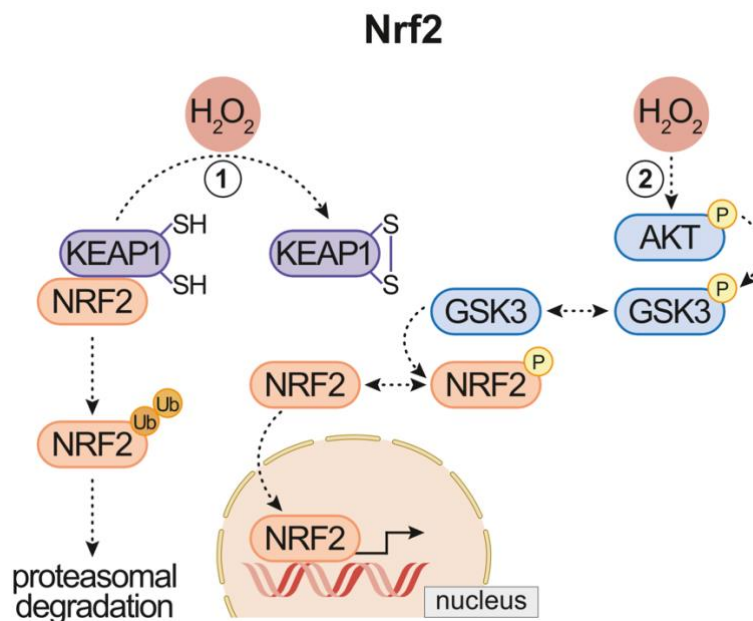


Figure 5 : Voie du NRF2 dépendant de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[52].

Dans des conditions non stressées, NRF2 se lie à l'adaptateur KEAP1 sensible à l'oxydoréduction pour être dégradé. En cas de stress oxydatif, KEAP1 forme un disulfure intramoléculaire et reloue NRF2. NRF2 est également la cible d'une phosphorylation inhibitrice par GSK3, via une voie sensible à la régulation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Le facteur de transcription nucléaire $\kappa B$ (NF $\kappa$ B)

La régulation du facteur de transcription nucléaire  $\kappa B$  (NF $\kappa$ B) est complexe[53], impliquant de nombreuses molécules régulatrices[54]. NF $\kappa$ B est l'acteur principal de l'inflammation, qui est associée à une production significative de  $H_2O_2$ . Il n'est donc pas étonnant que NF $\kappa$ B soit sujet à une régulation redox. L'impact de  $H_2O_2$  sur la fonction de NF $\kappa$ B est à la fois stimulant et inhibiteur selon le contexte[55]. Le  $H_2O_2$  dans le cytosol peut activer la voie NF $\kappa$ B par le biais de l'oxydation médiée par le  $H_2O_2$  des kinases de l'inhibiteur de NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B), qui contrôlent négativement la stabilité de l'I $\kappa$ B[56]. De plus,  $H_2O_2$  peut influencer directement NF $\kappa$ B en raison de la présence de cystéines oxydables dans la région de liaison à l'ADN de NF $\kappa$ B. Dans ce contexte, l'augmentation de la production nucléaire de  $H_2O_2$  a inhibé la liaison de NF $\kappa$ B à l'ADN, réduisant ainsi son activité transcriptionnelle[57-60].

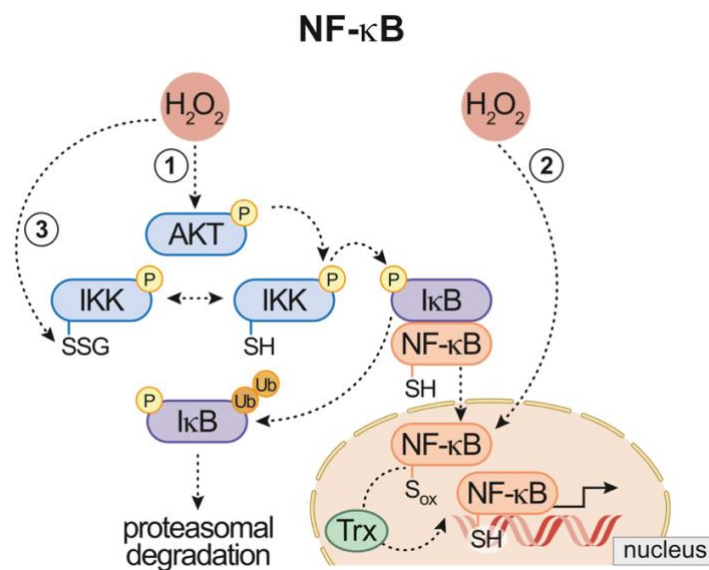


Figure 6 : Voie du NF- $\kappa$ B dépendant du  $H_2O_2$ .

Dans des conditions physiologiques, le NF- $\kappa$ B est complexé avec l'inhibiteur I $\kappa$ B et retenu dans le cytoplasme. L'activation médiée par redox de la kinase IKK entraîne une phosphorylation et une dégradation protéasomale de l'I $\kappa$ B, qui libère NF- $\kappa$ B. Un thiol sensible au redox dans le domaine de liaison à l'ADN de NF- $\kappa$ B doit être réduit par Trx nucléaire pour permettre l'activation. La S-glutathionylation de la sous-unité  $\beta$  de l'IKK entraîne l'inactivation de l'IKK et une diminution de l'activité transcriptionnelle du NF- $\kappa$ B.

## Le facteur inductible par l'hypoxie 1a (HIF1- $\alpha$ )

Le facteur inductible de l'hypoxique(HIF) est fondamental en tant que régulateur principal des réponses transcriptionnelles lors de la baisse des niveaux d'oxygène[61, 62]. L'hypoxie, caractérisée par un déficit en oxygène, a été associée à une augmentation de la production d'  $O_2^{\bullet-}$  (et par conséquent de  $H_2O_2$ ) en raison de l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale[63].

Dans le même ordre d'idées, des études ont démontré que l'hypoxie chronique intermittente, une condition potentiellement mortelle observée dans diverses affections, dont l'apnée du sommeil (caractérisée par une perturbation de la respiration pendant le sommeil), active la signalisation redox. Cette activation contribue à déclencher de multiples réponses à la fois systémiques et cellulaires. Ces réponses incluent des modifications de la pression artérielle, une libération accrue de neurotransmetteurs et de facteurs neurotrophiques, ainsi qu'une altération du sommeil et des fonctions cognitives. Ces phénomènes ont été associés à l'activation de voies de seconds messagers et de régulateurs de la transcription en réaction à l'hypoxie[64].

Les oxydants sont indispensables dans la stabilisation du HIF1- $\alpha$  pendant l'hypoxie, ce qui contribue à l'adaptation hypoxique[65, 66]. Ils agissent en modulant l'activité des prolylhydroxylases (PHD2) du HIF1- $\alpha$ , lesquelles servent à détecter la disponibilité de l'oxygène. Les oxydants interfèrent également avec la disponibilité du  $Fe^{2+}$  dans le site catalytique des PHD2, inhibant leur activité et favorisant ainsi la transcription médiée par le HIF1- $\alpha$ . Par ailleurs, des niveaux élevés de ROS peuvent aussi inactiver PHD2 par le biais de sa dimérisation dépendante de la régulation redox, stabilisant ainsi HIF1- $\alpha$  même en présence d'oxygène[67]. De même, l'influence des oxydants sur les voies du HIF1- $\alpha$  se manifeste en conditions de normoxie, ce qui permet de moduler les réponses adaptatives [68-70]. C'est pourquoi, ce facteur essentiel est responsable de l'homéostasie vasculaire, cellulaire et métabolique, ainsi que de l'apoptose[71-73]. Ses actions bénéfiques dans la lutte contre les cellules cancéreuses ont récemment été préconisées[72].

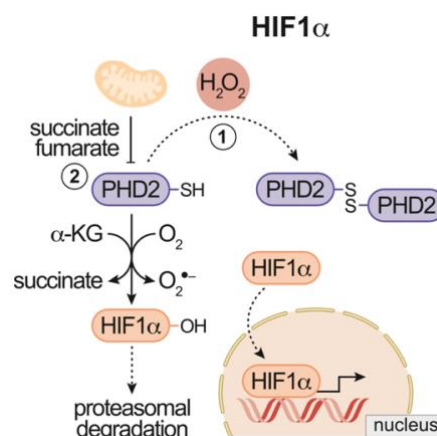


Figure 7 : Voie du HIF1a dépendant du  $H_2O_2$ .

La prolyl hydroxylase PHD2 inactive le HIF1- $\alpha$ , qui est destiné à être dégradé par le protéasome. PHD2 contient une cystéine régulée par l'oxydoréduction et est inactivée lors de l'oxydation en formant un homodimère, ce qui permet à HIF1- $\alpha$  de fonctionner. L'activité de PHD2 est également inhibée de manière compétitive par les métabolites TCA dérivés des mitochondries.

Ces exemples démontrent que l'activité de divers facteurs de transcription est étroitement dépendante des voies de signalisation redox. Cette régulation redox peut prendre la forme d'une modification directe du facteur de transcription lui-même par des modifications post-traductionnelles oxydatives, ou indirecte, en influençant les protéines avec lesquelles il interagit.

## L'OxInflammation

Le terme "OxInflammation" a été introduit en biomédecine pour souligner la relation étroite entre la perturbation de l'équilibre rédox et l'homéostasie immunitaire[74]. Fondamentalement, l'inflammation et le stress oxydatif sont interdépendants, chacun étant nécessaire à l'autre. En d'autres termes, ce sont des facettes d'un même processus.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, il est essentiel pour les cellules de maintenir un équilibre rédox stable, car toute perturbation dans les échanges d'électrons entre donneurs et accepteurs d'électrons peut avoir des répercussions majeures sur les processus métaboliques et peut même causer des dommages biologiques et des maladies[75]. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont des acteurs majeurs dans ce processus, agissant également comme acteurs clés de la signalisation cellulaire. Leur régulation temporelle et spatiale est un mécanisme subtil et complexe. En effet, des niveaux modérément élevés entraînent des modifications métaboliques, une prolifération cellulaire, voire une mort cellulaire régulée, tandis que des niveaux excessifs provoquent des lésions graves aux membranes cellulaires et aux organites, en particulier les mitochondries, pouvant conduire à la nécrose. Le résultat final ne dépend pas seulement de la concentration de ROS/RNS, mais également de l'état du système adaptatif antioxydant, qui est un réseau complexe de voies moléculaires impliquées dans la régulation de l'équilibre rédox et dans la défense contre les stress oxydatifs que nous avons déjà détaillé.

La réponse inflammatoire est déclenchée par l'activation de facteurs de transcription sensibles au rédox, tels que le NF- $\kappa$ B des lymphocytes B activées, la protéine activatrice-1 et les composants de complexes protéiques impliqués dans la régulation de l'immunité innée, ainsi que les inflammasomes [76]. Quel que soit le chemin emprunté, cela conduit à la production de cytokines, qui amplifient l'inflammation, principalement par le biais de réactions rédox. Des cytokines, telles que les interleukines ; IL-6, l'IL-1, l'IL-18, l'IL-33, TNF- $\alpha$  et l'IL-8 sont toutes capables de générer des ROS/RNS par divers mécanismes, enzymatiques et non enzymatiques. Les phagocytes, en particulier, possèdent des enzymes qui traduisent les signaux pro-inflammatoires en production de ROS/RNS. La quantité et l'effet de ces espèces dépendent en grande partie du stimulus initial. Les (NOX), notamment NOX2 et NOX4 présentes dans les phagocytes, ainsi que la myéloperoxydase (MPO), jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée en produisant des ROS/RNS. Cependant, une activation excessive de ces enzymes dans le cadre d'une inflammation chronique peut entraîner des effets indésirables contribuant à diverses maladies, en particulier les troubles cardiovasculaires et neurodégénératifs[77].

L'OxInflammation est de nature systémique et peut se propager entre les organes, ce qui est particulièrement préoccupant dans des maladies neurodégénérative telles que la maladie d'Alzheimer (MA). La neuroinflammation est l'une des caractéristiques majeures de

la MA, avec la formation de plaques bêta-amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. L'activation chronique des microglies, en particulier, est un événement initial dans l'inflammation du système nerveux central (SNC) et peut être provoquée par divers facteurs, y compris les espèces réactives, les infections et les traumatismes[77]. Une augmentation du stress oxydatif dans le cerveau est également liée à la MA, en grande partie due à des dysfonctionnements mitochondriaux, à la formation de ROS/RNS et aux peptides anormaux associés à la MA, comme les oligomères A $\beta$  et la protéine tau[74].

La production excessive de ROS/RNS par des enzymes telles que NOX2 et NOX4 dans le cerveau est également un facteur clé dans la pathogenèse de la MA. Ces enzymes sont largement exprimées dans le cerveau des patients atteints de MA, en particulier dans les microglies activées. Leur activité peut contribuer à la neurotoxicité et à l'inflammation du cerveau[78].

## L'inflammation, une réponse biologique

L'inflammation représente la réaction du système immunitaire face à des stimuli nuisibles, tels que des agents pathogènes, des cellules endommagées, des substances toxiques ou des radiations [79]. Elle a pour rôle d'éliminer ces stimuli nuisibles et de déclencher le processus de guérison [80]. Ainsi, l'inflammation constitue un mécanisme de défense essentiel pour maintenir la santé[81]. En général, lors de réponses inflammatoires aiguës, des événements et des interactions cellulaires et moléculaires se mettent en place de manière efficace pour minimiser les dommages ou les infections imminentes. Ce mécanisme de régulation contribue au rétablissement de l'équilibre tissulaire normal et à la résolution de l'inflammation aiguë. Cependant, si celle-ci n'est pas maîtrisée, elle peut évoluer vers une inflammation chronique, qui peut être liée à diverses maladies inflammatoires chroniques [82]

### *Les mécanismes de la réponse inflammatoire*

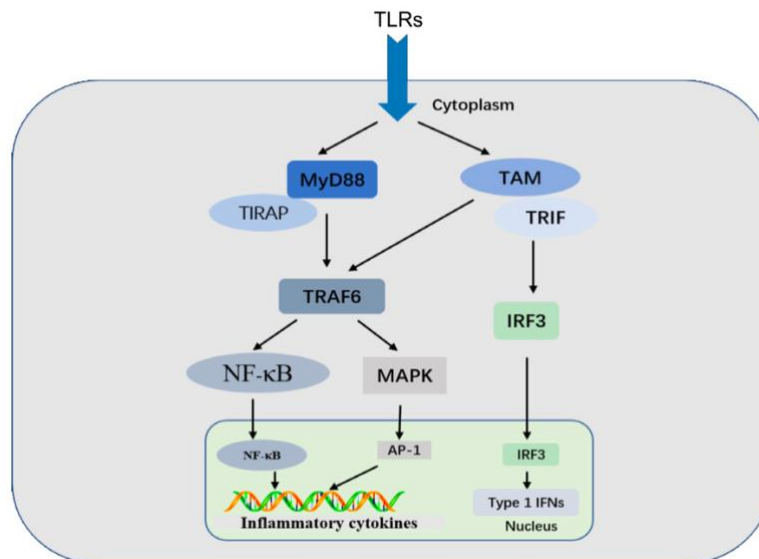
La réponse inflammatoire est l'activation coordonnée de voies de signalisation qui régulent les niveaux de médiateurs inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang [8]. Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de sa localisation dans l'organisme, ils partagent tous un mécanisme commun, que l'on peut résumer comme suit : 1) les récepteurs de la surface cellulaire reconnaissent les stimuli nuisibles ; 2) les voies inflammatoires sont activées ; 3) les marqueurs inflammatoires sont libérés ; et 4) les cellules inflammatoires sont recrutées.

L'activation des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires est un processus clé dans la réponse inflammatoire. Les structures microbiennes appelées motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés au danger (DAMP) provenant de l'organisme lui-même peuvent déclencher cette réponse en activant des récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR), présents dans divers types de cellules, y compris celles du système immunitaire [83, 84].

Les familles de PRR comprennent les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de la lectine de type C (CLR), les récepteurs similaires au gène inducible par l'acide rétinoïque (RIG)-I (RLR), et les récepteurs de type NOD (NLR)[85]. Les TLR sont particulièrement bien étudiés et participent activement à l'activation de la réponse inflammatoire. Ils transmettent les signaux des PAMP et des DAMP via le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88) et déclenchent une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 ou IRF3[86, 87].

Les récepteurs TLR, notamment TLR4, sont impliqués à la fois dans les réponses inflammatoires aux infections et aux lésions tissulaires, suggérant des similitudes entre les réactions inflammatoires infectieuses et non infectieuses. Ainsi, l'activation des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires est un mécanisme clé dans la régulation de la réponse inflammatoire[88, 89].

Les voies inflammatoires sont les moteurs principaux dans le développement de nombreuses maladies chroniques et partagent des médiateurs inflammatoires ainsi que des voies de régulation communes. Ces voies sont activées en réponse à des stimuli inflammatoires tels que les produits microbiens, les cytokines (comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ ), qui interagissent avec des récepteurs spécifiques tels que les TLR, l'IL-1R, l'IL-6R et le TNFR [90]. L'activation de ces récepteurs déclenche des voies de signalisation intracellulaires essentielles, notamment les MAPK, NF- $\kappa$ B et JAK-STAT. Ces mécanismes sont les piliers dans la médiation de l'inflammation en réponse à des facteurs infectieux tels que les bactéries, les virus et d'autres micro-organismes [91-93].

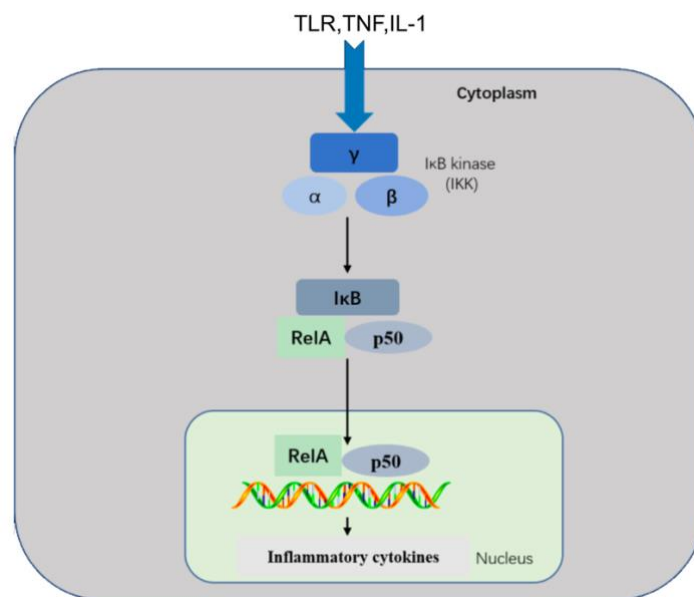


**Figure 8 : Signalisation TLR.**

Les voies dépendantes de MyD88 et dépendantes de TRIF sont présentées. La signalisation via les TLR active le système intracellulaire cascades de signalisation qui conduisent à la translocation nucléaire de AP-1 et NF- $\kappa$ B ou IRF3, qui régule la réponse inflammatoire [94].

## La voie du NF- $\kappa$ B

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un acteur clé dans divers processus biologiques, y compris l'inflammation, la réponse immunitaire, la survie cellulaire et l'apoptose (mort cellulaire programmée)[95]. La famille NF- $\kappa$ B est composée de cinq facteurs de transcription apparentés : P50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel [96, 97]. L'activation de NF- $\kappa$ B est déclenchée par divers stimuli, tels que des composés dérivés de pathogènes, des cytokines inflammatoires et diverses enzymes [98, 99]. Normalement, NF- $\kappa$ B est inhibé dans le cytoplasme par des protéines appelées I $\kappa$ B . Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) activent la kinase I $\kappa$ B (IKK) via des mécanismes de signalisation similaires, comprenant deux sous-unités kinases (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) et une sous-unité régulatrice (IKK $\gamma$ ). L'IKK régule l'activation de NF- $\kappa$ B en phosphorylant l'I $\kappa$ B. Cette phosphorylation conduit à la dégradation de l'I $\kappa$ B par le protéasome, libérant ainsi NF- $\kappa$ B pour sa translocation dans le noyau cellulaire, où il active la transcription des gènes [100]. Cette voie de signalisation régule la production de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules inflammatoires, vecteur essentiel dans la réponse inflammatoire.



**Figure 9 : Voie inflammatoire du NF- $\kappa$ B.**

*Cette voie est déclenchée par les TLR et les cytokines inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1, conduisant à l'activation de complexes RelA/p50 qui régulent l'expression des cytokines inflammatoires. La signalisation NF- $\kappa$ B nécessite des sous-unités IKK qui régulent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par phosphorylation I $\kappa$ B. [94]*

## La voie des MAPK

La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) est une cascade de réactions biochimiques essentielle à la régulation des réponses cellulaires face à divers stimuli. Ces stimuli comprennent le stress osmotique, les mitogènes (substances stimulant la division cellulaire), les chocs thermiques et les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Les MAPK dirigent ces réponses cellulaires et influencent des processus vitaux tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'apoptose [90, 101].

Dans les cellules mammifères, cette famille de MAPK inclut des membres clés tels que :

1. ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2) : Elles sont activées principalement par des mitogènes et des signaux de différenciation.
2. p38 MAP Kinase: Ces kinases réagissent particulièrement aux stimuli inflammatoires et au stress cellulaire.
3. JNK (c-Jun N-terminales Kinases): Elles sont également activées en réponse au stress et aux stimuli inflammatoires[102].

Chaque voie de signalisation MAPK comprend au moins trois composants principaux : une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK), et une MAPK kinase kinase (MAPKKK). Les MAPKKK activent les MAPKK, qui à leur tour activent les MAPK. Par exemple, MKK1 et MKK2 activent ERK1/2, MKK4 et MKK7 activent JNK, et MKK3 et MKK6 activent p38.

L'activation des MAPK, notamment ERK1/2 et JNK, entraîne la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule. Cela déclenche des réponses cellulaires telles que l'inflammation. Cette cascade de réactions est cruciale pour la capacité des cellules à réagir rapidement et spécifiquement aux signaux de leur environnement, assurant ainsi leur adaptation aux conditions changeantes[101, 103, 104].

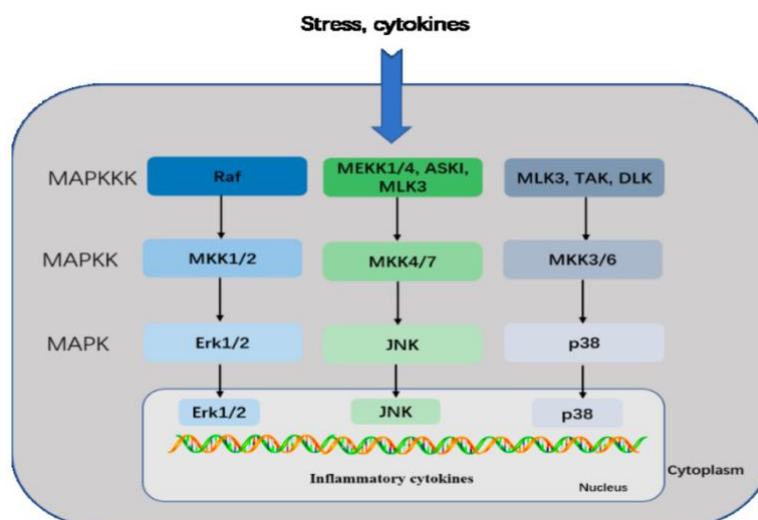


Figure 10 : Voie inflammatoire du MAPK.

Cette voie médie la signalisation intracellulaire initiée par des stimuli extracellulaires, tels que le stress et les cytokines. Les MAPKKK phosphorylent et activent les MAPKK, qui à leur tour phosphorylent et activent les MAPK. La famille des mammifères MAPK inclut Erk1/2, JNK et p38. Dans la voie Erk1/2, Erk1/2 est activé par MKK1/2, qui est activé par Raf. Dans le parcours JNK, JNK est activé par MKK4/7, qui est activé par MEKK1/4, ASK1 et MLK3. Dans la voie p38, p38 est activé par MKK3/6, qui est lui-même activé par MLK3, TAK et D [94].



## La voie JAK-STAT

La voie JAK-STAT est une voie de signalisation hautement conservée. Elle joue un rôle crucial dans la régulation de l'expression génique en réponse à divers facteurs extracellulaires, tels que les cytokines, les facteurs de croissance, les interférons, la leptine et l'hormone de croissance[105]. Cette voie permet la transmission directe de signaux extracellulaires vers la régulation de l'expression génique.

Dans cette voie, les récepteurs associés aux JAK sont activés par leurs ligands, ce qui entraîne leur autophosphorylation ainsi que la phosphorylation réciproque entre les JAK. Cette phosphorylation crée des sites d'ancrage pour les STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), qui sont des facteurs de transcription initialement présents dans le cytoplasme sous forme inactive. Une fois recrutés sur ces sites d'ancrage, les STAT subissent une phosphorylation suivie de leur dimérisation, ce qui les prépare à être transposés dans le noyau cellulaire [106]. Il est important de noter que la phosphorylation de la tyrosine joue un rôle clé dans la dimérisation des STAT et leur liaison à l'ADN[107]. En conséquence, la voie JAK-STAT permet la conversion directe des signaux extracellulaires en réponses transcriptionnelles. Par exemple, lorsque les membres de la famille des interleukines 6 (IL-6) se lient aux récepteurs de la membrane plasmique, cela active les protéines JAK-STAT. Les protéines STAT transloquées dans le noyau se lient ensuite aux régions promotrices des gènes cibles pour réguler la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire[108].

Il est important de noter que la perturbation de l'activité des voies de signalisation telles que NF- $\kappa$ B, MAPK ou JAK-STAT est associée à diverses maladies, notamment les maladies inflammatoires, auto-immunes, métaboliques et le cancer [109]. Ces voies de signalisation par les facteurs de transcription conduisent à la sécrétion de cytokines[110, 111], et de nombreux facteurs de transcription régulent l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, tels que l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 [112], les facteurs de stimulation des colonies (CSF), les interférons, le facteur de croissance transformant (TGF) et les chimiokines. Cette régulation complexe est cruciale pour la réponse immunitaire et inflammatoire de l'organisme.

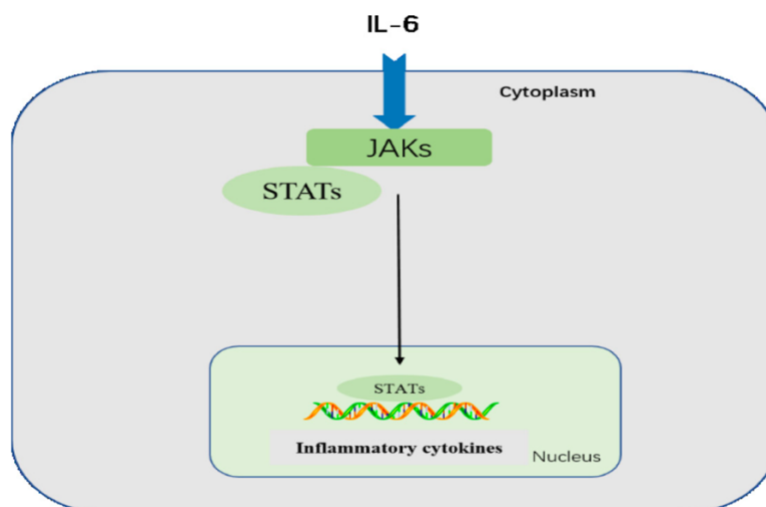


Figure 11 : Voie inflammatoire JAK-STAT.

Après la liaison de l'IL-6, le signal est transduit par un récepteur pour activer les JAK, qui activent ensuite les STATs. Les STATs sont déphosphorylés dans le noyau, conduisant à l'activation des cytokines en aval [94].

### *Les marqueurs inflammatoires*

Les marqueurs inflammatoires sont des figures clés dans les applications cliniques en tant qu'indicateurs des processus biologiques, qu'ils soient normaux ou pathologiques, et ils sont essentiels pour évaluer l'efficacité des interventions thérapeutiques. Ils présentent une grande valeur prédictive dans le contexte des maladies inflammatoires. Leur corrélation avec les causes et les conséquences de ces affections, telles que les maladies cardiovasculaires, les dysfonctionnements endothéliaux et les infections, est bien établie[113-118].

L'activation de cellules inflammatoires, notamment les macrophages et les adipocytes, en réponse à des stimuli, induit la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ainsi que de protéines et d'enzymes inflammatoires. Ces composés se présentent comme des biomarqueurs potentiels qui peuvent être utilisés dans le diagnostic des maladies, la prédiction du pronostic et la prise de décisions thérapeutiques éclairées. Cette recherche sur les marqueurs inflammatoires revêt une importance considérable pour la médecine, contribuant à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux maladies inflammatoires et à l'amélioration des soins et de la gestion des patients[119].

### *Les cytokines inflammatoires*

Les cytokines, libérées principalement par les cellules immunitaires telles que les monocytes, les macrophages et les lymphocytes, occupent une place prépondérante dans la modulation de l'inflammation. Ces molécules se divisent en deux catégories : les cytokines pro-inflammatoires, qui favorisent l'inflammation, et les cytokines anti-inflammatoires, qui l'inhibent. Les cytokines inflammatoires incluent les interleukines (IL), les facteurs de stimulation des colonies (CSF), les interférons (IFN), le facteur de nécrose tumorale (TNF), le facteur de croissance transformant (TGF) et les chimiokines. Elles sont produites par les cellules principalement dans le but de recruter des leucocytes vers le site d'une infection ou d'une blessure[120].

Ces cytokines sont des piliers dans la modulation de la réponse immunitaire face à l'infection ou à l'inflammation, et elles régulent elles-mêmes le processus inflammatoire par le biais d'un réseau complexe d'interactions. Toutefois, une production excessive de cytokines inflammatoires peut avoir des conséquences néfastes, telles que des lésions tissulaires, des perturbations hémodynamiques, des dysfonctionnements d'organes, et même le décès[121, 122]. Par conséquent, une compréhension approfondie de la régulation des voies de signalisation des cytokines est cruciale, car elle pourrait permettre une identification plus précise de l'inflammation déclenchée par un agent spécifique et ainsi améliorer le traitement des maladies inflammatoires [120].

### *Les protéines et enzymes inflammatoires*

Les protéines inflammatoires présentes dans la circulation sanguine, notamment la protéine C-réactive (CRP), l'haptoglobine, l'amyloïde A sérique, le fibrinogène et l'alpha 1-acide glycoprotéine [123], ont un impact décisif dans la restauration de l'équilibre biologique et la suppression de la croissance microbienne, indépendamment des anticorps, en réponse à des situations telles que des traumatismes, du stress ou des infections [124].

Parallèlement, une activation anormale de certaines enzymes, notamment le HMGB1 (high-mobility group box 1), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la NADPH oxydase (NOX), l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la cyclooxygénase (COX)-2, à une influence majeure dans le développement de maladies associées à l'inflammation, telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer [125-128]. Par exemple, l'HMGB1 extracellulaire exerce ses effets en activant les voies de signalisation associées aux récepteurs Toll-like (TLR) [129]. Le TLR4 est la principale cible de l'HMGB1 extracellulaire [130], déclenchant ainsi des cascades de signalisation intracellulaire dépendantes de MyD88, qui participent à l'activation des voies NF- $\kappa$ B et MAPK. Ce processus entraîne la libération de cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ [129].

En médecine, les protéines et enzymes inflammatoires ont trouvé une utilisation précieuse en tant que biomarqueurs pour détecter l'inflammation, l'infection et les traumatismes, contribuant ainsi à orienter les décisions cliniques.

### *Les autres marqueurs inflammatoires*

Les systèmes de défense antioxydants, tels que les enzymes antioxydantes, ont une influence majeure dans la régulation du stress oxydatif. Un stress oxydatif élevé peut induire la production de substances telles que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le malondialdéhyde (MDA), la 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) et les isoprostanes[126, 131]. Ces composés ont la capacité d'activer divers facteurs de transcription, notamment NF- $\kappa$ B, AP-1, p53 et STAT, ce qui peut entraîner une augmentation de l'expression des gènes liés aux facteurs de croissance, aux cytokines inflammatoires et aux chimiokines [132].

Le stress oxydatif est étroitement lié à la pathogenèse de nombreuses maladies, ce qui fait des produits issus du stress oxydatif des marqueurs précieux pour évaluer la réponse inflammatoire, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à diverses affections et à la détection précoce des processus inflammatoires en médecine.

### *Les types de cellules dans les réponses inflammatoires*

La réponse inflammatoire est orchestrée par un réseau complexe de divers types de cellules. Les macrophages, les monocytes et d'autres cellules activées sont indispensables dans les réponses locales aux lésions tissulaires et aux infections. Lorsque les cellules épithéliales et endothéliales sont endommagées, elles libèrent des facteurs déclenchant une cascade inflammatoire ainsi que des chimiokines et des facteurs de croissance qui attirent les neutrophiles et les monocytes. Les neutrophiles sont les premiers à être attirés sur le site de

la lésion, suivis des monocytes, des lymphocytes (y compris les cellules NK, T et B) et des mastocytes[133]. Les monocytes peuvent se transformer en macrophages et en cellules dendritiques, et ils sont recrutés par chimiotactisme dans les tissus endommagés. Les anomalies des cellules immunitaires associées à l'inflammation sont impliquées dans de nombreuses maladies, notamment l'asthme, le cancer, les maladies inflammatoires chroniques, l'athérosclérose, le diabète, les maladies auto-immunes et dégénératives.

Les neutrophiles, en plus de cibler les micro-organismes, peuvent également endommager les cellules et les tissus de l'hôte[134]. Ils sont des acteurs clés de la réponse inflammatoire, contribuant à activer les lymphocytes T et à attirer les monocytes et les cellules dendritiques[135]. Les macrophages ont un rôle central dans le déclenchement, le maintien et la résolution de l'inflammation en présentant des antigènes, en phagocytant et en modulant la réponse immunitaire grâce à la production de cytokines et de facteurs de croissance. Les mastocytes, situés dans le tissu conjonctif et les surfaces épithéliales, sont des effecteurs de l'inflammation, libérant divers médiateurs inflammatoires.

De plus, les plaquettes ont été identifiées comme ayant un impact sur les processus inflammatoires, de l'athérosclérose aux infections, en interagissant avec les cellules inflammatoires et en contribuant aux réponses inflammatoires. La réaction de phase aiguë (RPA) est la première réaction à une infection ou à une blessure, et il a été démontré que les plaquettes sont déterminantes dans son déclenchement. Les cellules immunitaires amplifient et maintiennent la RPA en libérant des médiateurs inflammatoires locaux après avoir été recrutées par des stimuli inflammatoires[136].

### *La résolution de l'inflammation*

Pour empêcher la progression d'une inflammation aiguë vers une inflammation chronique persistante, la réponse inflammatoire doit être supprimée afin d'éviter de nouvelles lésions tissulaires. La résolution de l'inflammation est un processus bien géré impliquant la production de médiateurs contrôlée dans l'espace et dans le temps, au cours de laquelle les gradients de chimiokines sont dilués au fil du temps.

Les globules blancs circulants finissent par ne plus percevoir ces gradients et ne sont plus recrutés sur les sites de la lésion. Un dérèglement de ce processus peut conduire à une inflammation chronique incontrôlée[137]. Les processus de résolution de l'inflammation qui rectifient l'homéostasie tissulaire comprennent la réduction ou l'arrêt de l'infiltration tissulaire par les neutrophiles et l'apoptose des neutrophiles épuisés, la contre-régulation des chimiokines et des cytokines, la transformation des macrophages de cellules classiquement activées en cellules alternativement activées, et le début de la cicatrisation[138, 139].

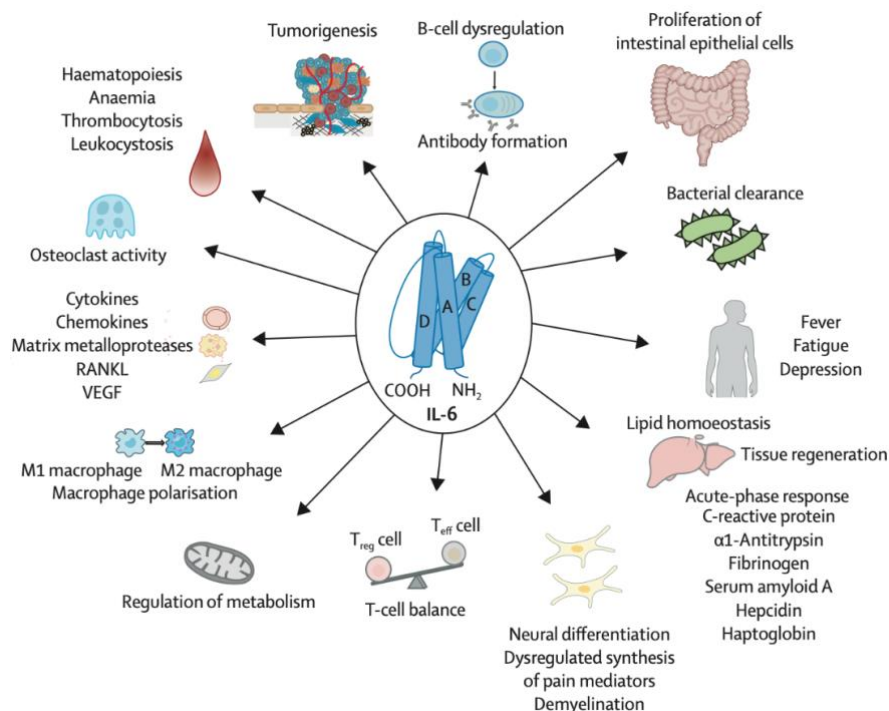
L'inflammation chronique survient lorsque les mécanismes inflammatoires aigus ne parviennent pas à éliminer les lésions tissulaires[140] et peut conduire à une série de maladies, telles que les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le diabète de type 2, la polyarthrite rhumatoïde et les cancers[141].

## L'Interleukine 6

L'interleukine-6 (IL-6), initialement reconnue comme un facteur de différenciation des cellules B[142], s'est avérée être une cytokine aux rôles multiples, influençant la réponse de la phase aiguë de l'inflammation, l'hématopoïèse, le maintien de la masse osseuse et musculaire, l'activité du système nerveux central et le métabolisme. Sécrétée par divers types cellulaires, tels que les leucocytes, les adipocytes et les myocytes, l'IL-6 agit à la fois de manière autocrine, paracrine et endocrine[143, 144].

Moléculairement, l'IL-6 utilise trois voies de signalisation intracellulaire : la voie classique, la trans-signalisation et la signalisation en grappe. Bien que traditionnellement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6 démontre également des fonctions régénératrices et anti-inflammatoires, en particulier lorsqu'elle est sécrétée par le muscle squelettique pendant l'activité physique[145, 146].

Les effets métaboliques de l'IL-6 sont variés, contribuant à la susceptibilité au diabète de type 2 tout en favorisant des processus anti-diabétogènes[147]. Malgré ses effets contradictoires, l'IL-6 régule également d'autres processus, tels que l'hypertrophie musculaire et la remodelage osseux. Une perspective évolutive suggère que l'IL-6 a évolué pour moduler l'allocation d'énergie en réponse au stress métabolique dans divers tissus, expliquant ainsi ses effets diversifiés[148].



**Figure 12 : Les effets pléiotropes de l'IL-6.**

IL-6, qui se compose d'un ensemble de quatre hélices, est une cytokine maîtresse qui exerce divers effets biologiques. En plus de provoquer l'inflammation, la fièvre, la cytokinémie et la tumorigenèse, l'IL-6 régule le métabolisme, le renouvellement osseux et l'hématopoïèse, et est essentielle pour l'immunité innée et adaptative. Dans le foie, l'IL-6 contribue à la régénération tissulaire, à l'équilibre lipidique et à l'induction de la réponse de phase aiguë. Cette cytokine favorise également la polarisation des macrophages de l'état pro-inflammatoire M1 à un phénotype anti-inflammatoire M2 et est nécessaire à la prolifération de l'épithélium intestinal. IL-6 = interleukine-6. RANKL = ligand activateur du récepteur du facteur nucléaire  $\kappa$ B. VEGF = facteur de croissance endothélial vasculaire.[149]

<b>Fonctions métaboliques</b>	
<i>Catabolisme</i>	<i>Anabolisme</i>
Induit la lipolyse et la libération d'acides gras libres à partir des adipocytes et du muscle squelettique [150-152].	Augmente la sécrétion d'insuline/régule la production de GLP-1 [153-155].
L'administration chronique contribue à l'insulinorésistance dans le foie, les tissus adipeux et musculaires [156-158].	L'administration aiguë augmente la sensibilité à l'insuline dans le muscle [159, 160].
Induit la sécrétion de cortisol [161, 162].	Augmente la sécrétion d'hormone GH de l'hypophyse [163].
Augmente la glycémie pendant l'exercice [164].	Peut augmenter l'absorption d'acides gras dans le muscle squelettique [165, 166].
<b>Fonction immunitaires</b>	
<i>Pro-inflammatoire</i>	<i>Anti-inflammatoire</i>
Améliore la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps [142].	Régule le trafic des neutrophiles sur le site d'infection en diminuant la production de chimiokines et en augmentant l'apoptose [167].
Orienté la différenciation des cellules T vers les profils TH2 et TH17 tout en inhibant la formation de TH1 et de Treg [168-171].	Inhibe les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ et IL-1 $\beta$ ) et augmente la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1RA) [162, 172, 173].
Régule la production de protéines de la phase aiguë (protéine C-réactive, amyloïde sérique A, fibrinogène) et l'élévation de la température corporelle [174, 175].	Sensibilise les macrophages à la polarisation M2 et renforce le phénotype M2 [176].
Stimule la production de cellules souches hématopoïétiques et de cellules myéloïdes dans la moelle osseuse [177, 178].	Régule la réparation des tissus et la régénération de l'épithélium intestinal et du foie [179, 180].
Agit comme un agent chimiotactique pour les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T [181, 182].	
<b>Fonctions musculo-squelettiques</b>	
<i>Catabolisme</i>	<i>Anabolique</i>
Favorise la dégradation des protéines musculaires lorsqu'il est élevé de manière chronique [183, 184].	Hypertrophie musculaire squelettique via la prolifération et la différenciation des cellules satellites [185].
Induit la différenciation ostéoclastique et est associée à la perte osseuse résultant du retrait des œstrogènes [186].	Induit une différenciation ostéoblastique précoce et pourrait favoriser la formation osseuse [187].

Figure 13 : Choix d'impacts de l'IL-6 sur divers systèmes organiques dans l'ensemble du corps.

L'IL-6 présente une diversité de fonctions métaboliques, immunitaires et musculosquelettiques contradictoires, largement dépendantes de la durée d'élévation des niveaux d'IL-6. À l'exception des effets immunologiques, les impacts décrits sont principalement observés lors de l'administration d'IL-6 chez des individus en bonne santé, qu'ils soient humains ou animaux.

## L'oxygène comme stimulus d'information

Le « Normobaric oxygen paradox » (NOP)

Les réactions cellulaires vitales requièrent impérativement la présence d'oxygène. Toutefois, lorsque la quantité d'oxygène dissoute dans le sang est inférieure à la normale, on parle d'hypoxémie. Cette condition peut entraîner une mauvaise oxygénation des tissus et des organes périphériques, occasionnant une hypoxie, c'est-à-dire un déséquilibre entre l'offre et la demande d'oxygène[188]. En cas de persistance, cette situation peut causer un stress hypoxique, qui peut affecter la fonctionnalité des organes et même entraîner une déficience fonctionnelle permanente[189]. Pour éviter ce type de dommages, l'hypoxie induit l'expression génique cellulaire de protéine, favorisant plusieurs processus visant à améliorer l'apport en oxygène. Il s'agit notamment de l'angiogenèse, de la prolifération et de la différenciation des cellules souches, de la protection et de la réparation des cellules, ainsi que de l'apoptose. La plupart de ces processus sont régulés par l'activité de facteurs de transcription connus sous le nom de facteurs inductibles par l'hypoxie (HIF)[190].

L'oxygène est largement utilisé comme traitement pour prévenir ou remédier à l'hypoxie en milieu clinique, notamment dans les unités de soins intensifs (USI), étant donné son faible coût et son innocuité [191]. Toutefois, l'hyperoxémie n'est pas systématiquement évaluée. En réalité, la surveillance de l'hypoxémie se fait généralement à l'aide de la saturation périphérique en oxygène (SpO<sub>2</sub>), qui ne permet pas de détecter un niveau excessif d'oxygène. Par conséquent, l'administration d'oxygène n'est pas fréquemment ajustée pour atteindre la normoxie. Ainsi, de nombreux patients de l'USI peuvent être exposés à des épisodes d'hyperoxémie (PaO<sub>2</sub> élevée), souvent considérés comme plus tolérables par les cliniciens que l'hypoxie.

Il convient de souligner que même une légère hyperoxie peut causer des dommages chez les patients gravement malades, contrairement à ce qui peut être supposé à tort. En effet, des niveaux prolongés d'hyperoxie ont été associés à une augmentation de la mortalité [192] et à divers effets indésirables tels qu'une réduction de la clairance mucociliaire et de l'atélectasie [193], une vasoconstriction pulmonaire [194] qui peut aggraver le manque d'oxygène et provoquer des lésions tissulaires directes [195], ainsi qu'une neurotoxicité [196]. Néanmoins, dans certaines situations médicales spécifiques, comme l'oxygénothérapie hyperbare [197] ou les manœuvres de pré-oxygénation pour prévenir l'hypoxie lors d'interventions invasives telles que la bronchoscopie ou l'intubation oro/nasotrachéale, une pression partielle élevée d'oxygène peut être nécessaire [198].

Une tendance actuelle consiste non seulement à viser la normoxie, mais aussi à recourir à des stimuli hyperoxiques intermittents, impliquant une exposition cyclique à l'hyperoxygénation [199]. On entend par stimulus hyperoxique intermittent une concentration élevée d'oxygène administrée pendant une période limitée, suivie d'un retour à une concentration d'oxygène plus faible, répété pendant plusieurs jours, voire plusieurs fois par jour [199, 200]. Il a été démontré que la diminution de la PaO<sub>2</sub> à partir d'un état hyperoxique produit un effet paradoxal, car les cellules réagissent comme si elles étaient en état d'hypoxie [70, 73]. En effet, il semble que les oscillations de la concentration d'oxygène puissent engendrer une hypoxie fonctionnelle et provoquer une réponse au stress hypoxique,

et ce, même en l'absence d'une hypoxie prolongée. Ce phénomène se manifeste particulièrement avec des fluctuations légères et cycliques de la pression partielle d'oxygène [71, 201, 202], et est étroitement associé à une production accrue d'érythropoïétine (EPO) chez les sujets humains [70, 203].

Il a été suggéré que les effets transcriptionnels de HIF sont principalement influencés par les changements relatifs de la disponibilité d'oxygène, plutôt que par des valeurs absolues hypoxiques ou hyperoxiques [204]. Le paradoxe de l'oxygène normobare (NOP) ou paradoxe hyperoxique-hypoxique, selon le contexte, avance que le fait de passer d'une période d'hyperoxémie à une normoxie serait interprété par les cellules comme une pénurie d'oxygène, déclenchant potentiellement une cascade de synthèse de gènes régulée par HIF-1 $\alpha$ , y compris la production d'EPO.

Ce paradoxe a été proposé pour la première fois en 2006 par Balestra et al. [70]. Dans cette étude, les auteurs ont constaté que l'exposition intermittente à l'hyperoxie/normoxie induisait la synthèse de l'EPO. Les auteurs ont également observé que l'oxygène hyperbare (HBO) était un inhibiteur important des taux sériques d'EPO jusqu'à 24 heures après le traitement hyperbare. En 2012, Cimino et ses collègues ont signalé que la réduction de la concentration d'O<sub>2</sub>, des niveaux hyperoxiques aux niveaux normoxiques, pouvait stimuler l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales ombilicales humaines [73]. Ils ont également constaté une augmentation de la concentration d'hémoglobine chez des volontaires sains (n = 24) exposés à des cycles d'hypoxie (FiO<sub>2</sub> 0,15) et d'hyperoxie (FiO<sub>2</sub> 1,0) tous les deux jours pendant 10 jours (5 séances). Ces études ont confirmé l'hypothèse selon laquelle un stimulus hyperoxique peut reproduire les avantages d'une réponse hypoxique (par la production ou la non-inhibition de HIF-1 $\alpha$ ) sans induire un état hypoxique potentiellement nuisible.

Hadanny et Efrati [205] ont proposé une explication similaire du paradoxe de l'oxygène normobare dans une revue récente, mais ont principalement discuté de l'exposition hyperbare à l'oxygène. Cependant, il a été suggéré que des expositions intermittentes à l'oxygène hyperbare ou normobare produiront des réactions similaires. Ils ont mis en évidence le mécanisme fondamental d'adaptation cellulaire à l'hypoxie, qui est basé sur la disponibilité des radicaux libres d'oxygène. La clé pour comprendre ce processus réside dans le rapport entre les ROS et la capacité de récupération. Les différentes étapes de ce phénomène peuvent être résumées comme suit :

1. Suite à une exposition à l'hyperoxie, la présence accrue de ROS entraîne une augmentation de l'activité de l'enzyme glutathion synthétase. Cette augmentation de la capacité de piégeage des molécules permet de maintenir les conditions oxydatives des cellules sous contrôle, empêchant ainsi les dommages potentiels causés par les espèces réactives à l'ADN et à d'autres processus cellulaires clés.
2. Lors du retour à la normoxie, la normalisation des niveaux d'oxygène et donc des ROS est rapidement établie, mais l'activité du pouvoir de piégeage des cellules reste élevée pendant une période plus longue. Cette activité dépasse la quantité de ROS normalement produite en présence d'une concentration physiologique d'oxygène. Ainsi, la présence de piègeurs plus importants que les ROS pourrait entraîner une



réponse cellulaire de type hypoxie lorsque le stimulus hyperoxique est interrompu. Moins d'HIF-1 $\alpha$  subit alors une dégradation protéasomale, favorisant la transcription de l'EPO, du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de tous les autres gènes liés à la cascade HIF.

3. L'exposition hyperoxique cyclique entraîne une diminution du rapport ROS/piégeur jusqu'à ce qu'il devienne progressivement similaire à l'équilibre présent dans des conditions hypoxiques. Moléculairement, la réduction de l'hyperoxie génère un état imitant l'hypoxie en diminuant le pourcentage de ROS/capacité de piégeage.

Cependant, ce mécanisme suscite plusieurs critiques. Tout d'abord, diverses études ont examiné les effets potentiels des ROS sur la régulation complexe des facteurs de signalisation intracellulaires (FSI) et ont constaté des rôles contradictoires. Certaines découvertes suggèrent que les ROS peuvent stabiliser le HIF en inhibant les protéines responsables de sa dégradation, tandis que d'autres montrent que les ROS peuvent induire la dégradation du HIF-1 $\alpha$  par la voie du protéasome[206-208]. En outre, la réponse cellulaire à l'hyperoxie-normoxie est régulée par l'interaction de deux facteurs de transcription, HIF-1 $\alpha$  et NRF2, ainsi que par d'autres facteurs tels que NF- $\kappa$ B et des réactions inflammatoires. L'équilibre dynamique entre ces facteurs pourrait jouer un rôle clé dans la régulation globale du mécanisme [71, 201].

Le mécanisme biologique qui sous-tend le paradoxe de l'oxygène normobare ainsi que les régulations délicates de la réponse cellulaire à l'oxygène et au stress oxydatif sont complexes et n'ont pas encore été entièrement élucidés. Bien que l'importance des ROS aient une place prépondérante dans ce mécanisme, de nombreux autres acteurs ont un rôle à jouer dans l'équilibre redox de la cellule et pourraient également expliquer ce paradoxe.

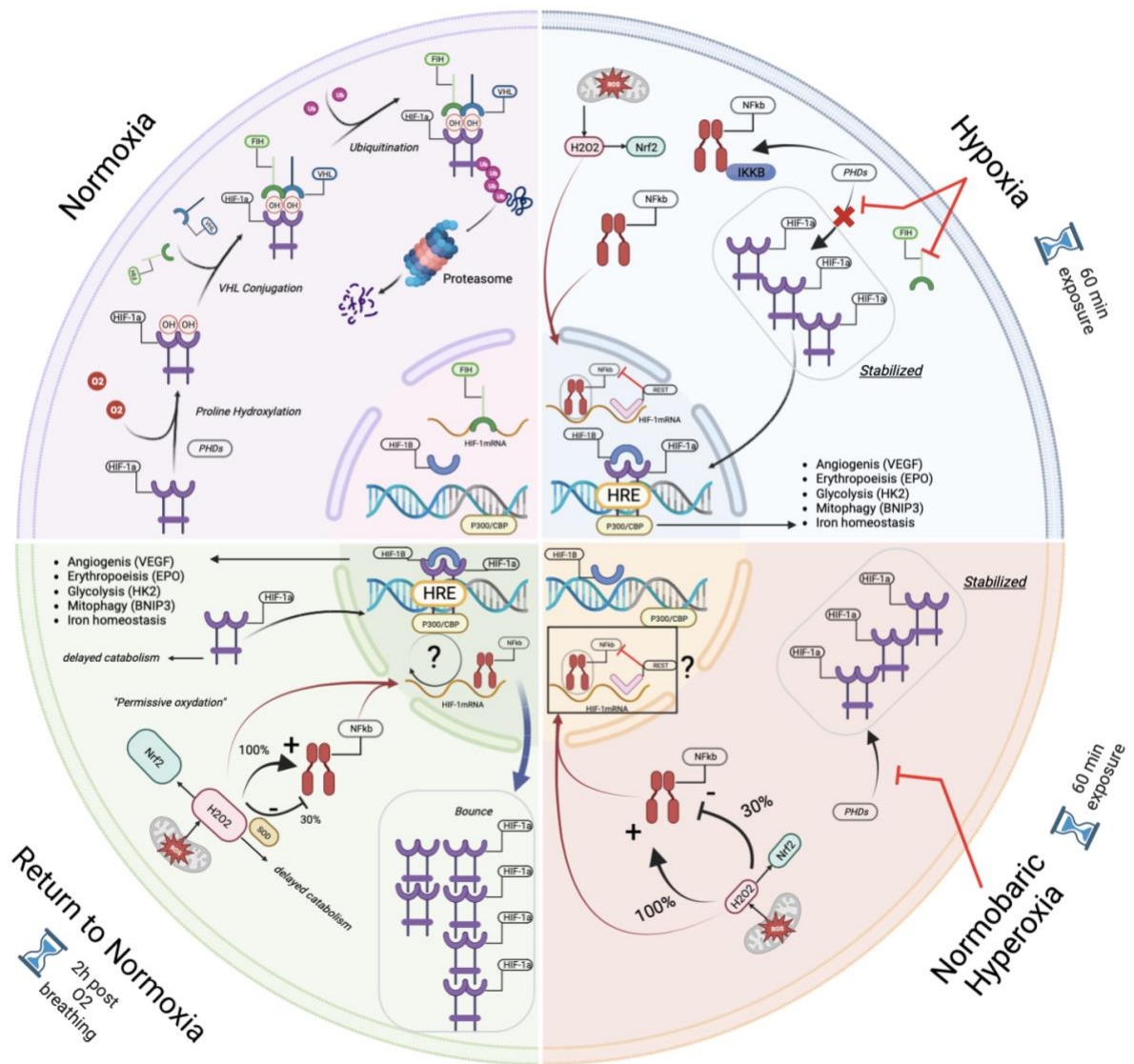


Figure 14 : Mécanisme du Normobaric Oxygen Paradox (NOP):

Tout d'abord, en normoxie, HIF-1 $\alpha$  est constamment produit et détruit sous l'intervention des PHD (prolyl hydroxylases) et de la FIH (factor inhibiting HIF). Pendant l'hypoxie et l'hyperoxie intermittente, la stabilisation de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans le cytosol est améliorée en réprimant l'activité des isoformes 1 à 3 des prolyl hydroxylases (PHDs) et de la FIH (uniquement en cas d'hypoxie), tandis que la synthèse nucléaire est bloquée en inhibant des protéines telles que REST. Par conséquent, pendant ces états modifiés d'oxygène, l'activation immunitaire semble débiter plus tôt que les mécanismes de défense antioxydants, permettant une cinétique subtile entre l'inflammation et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui jouent un rôle similaire à celui d'un "second messenger". Lors du retour à la normoxie, la déstabilisation de HIF-1 $\alpha$  par l'intervention des PHD et de la FIH est retardée en raison de l'activation tardive de la protection antioxydante, laissant la cellule dans un état de "permissive oxidation". Par la suite, la synthèse nucléaire démarre plus tôt, expliquant le phénomène de rebond observé dans la production de HIF-1 $\alpha$ . NRF2 et NF- $\kappa$ B sont surexprimés après une exposition à 100 % d'oxygène, alors qu'à 30 % seulement NRF2 est stimulé [209].

## Du Normobaric oxygen paradox (NOP) au Delta de pression partielle d'oxygène (DeltOx) : Objectif de la thèse

Le prix Nobel de 2019 a été décerné à trois chercheurs : William G. Kaelin Jr., Sir Peter J. Ratcliffe, et Gregg L. Semenza pour leurs découvertes sur la façon dont les cellules perçoivent et s'adaptent à la disponibilité en oxygène par l'intermédiaire du HIF-1 $\alpha$  [210], constituant ainsi une avancée significative dans le domaine de la médecine hyperbare. Aujourd'hui, un nouveau domaine de recherche est en émergence, situé entre la compréhension des mécanismes cellulaires et les avantages thérapeutiques de la médecine hyperbare. Ce domaine d'étude se concentre sur deux enjeux cruciaux liés à l'utilisation de l'oxygène : quelle quantité d'oxygène est optimale et à quelle fréquence devrait-elle être administrée? En effet, une gamme étendue de niveaux d'oxygène peut être employée et, en fonction de ces niveaux, le nombre de séances doit être adapté en conséquence.

En fonction de la pression partielle en oxygène dans les tissus, les effets thérapeutiques de l'oxygénation peuvent varier de la simple substitution de la substance à des niveaux normaux (environ 30 mmHg à 38 mmHg dans les tissus mous) lorsque l'hyperoxie normobare est utilisée. Il est à noter que la relation entre la dose et l'effet n'est pas linéaire, mais plutôt parabolique. Dans des conditions normobares, la pression partielle artérielle doit être maintenue dans une plage relativement étroite de 75-100 mmHg. En effet, une augmentation de la mortalité a été observée chez les patients gravement malades exposés à des niveaux hypoxiques ou hyperoxiques [211]. En outre, il est bien connu que l'exposition humaine à l'hyperoxie peut causer une toxicité de l'oxygène, tels que l'effet de Paul Bert sur le cerveau et l'effet de Lorrain-Smith sur les poumons.

Le dosage de l'exposition hyperbare (pression et temps) ainsi que la fréquence des répétitions sont actuellement limités par la toxicité pulmonaire et neurologique. Afin de garantir la sécurité du patient, les unités de toxicité de l'oxygène (OTUs : Oxygen Toxicity Units) ou les unités de toxicité pulmonaire (UTPDs : Units of pulmonary Toxicity Dose), sont calculées même si ces unités sont remises en question dans de nouvelles approches [212-214]. Une exposition permanente à l'oxygène hyperbare n'est de toute façon pas envisageable en clinique.

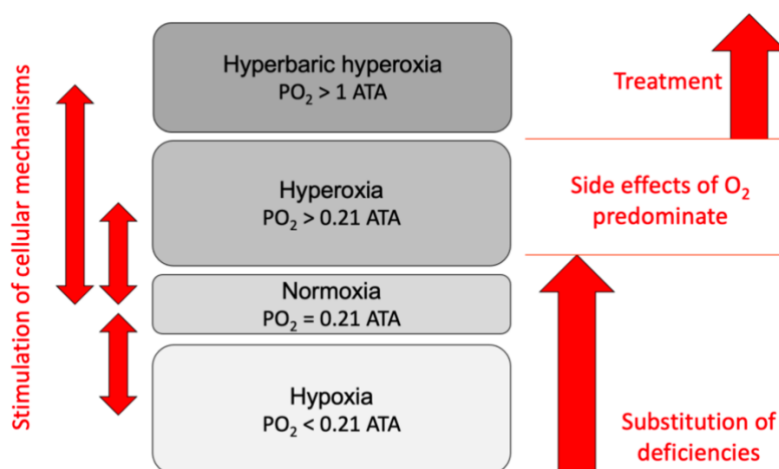


Figure 15 : Niveaux d'oxygène et leur utilisation thérapeutique ( $PO_2$ , pression partielle d'oxygène) [199].

Afin de perfectionner les protocoles cliniques basés sur ce modèle, les études à venir devraient également se pencher sur les effets "en aval" de l'activation transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ . Selon l'objectif thérapeutique, l'utilisation d'une hyperoxie légère (de 30 % à 50 %) pourrait s'avérer plus appropriée [72, 215], tandis que dans d'autres cas, provoquer intentionnellement un stress oxydant en administrant de l'hyperoxie normobare élevée 100% FiO<sub>2</sub> ou l'hyperoxie hyperbare élevée à très élevée (140% ou 250% FiO<sub>2</sub>) pourrait être une approche plus pertinente pour obtenir l'effet désiré.

Par exemple, Fratantonio et ses collègues [71] ont observé les réponses au stress oxydant dans les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) obtenues chez des individus en bonne santé après une exposition d'une heure à différents niveaux d'oxygène : une hyperoxie légère correspondant à 30 % d'oxygène, une hyperoxie élevée à 100 % d'oxygène, et une hyperoxie très élevée à 140 % d'oxygène. Leurs résultats ont montré que l'exposition à 30% de FiO<sub>2</sub> est perçue comme un stress hypoxique, déclenchant l'activation de HIF-1 $\alpha$  et NRF2, mais pas du NF-kB. En revanche, l'exposition à 100% de FiO<sub>2</sub> est associée à une augmentation progressive du stress oxydant, entraînant l'activation du Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) et du nuclear factor-kappa B (NF-kB), ainsi que la synthèse de glutathion (GSH). Suite à une exposition à 140% de FiO<sub>2</sub>, l'activation de HIF-1 $\alpha$  est complètement absente, et la réponse au stress oxydant, caractérisée par l'activation de NF-kB prédomine. Les niveaux de GSH intracellulaire et de métallopeptidase matricielle 9 (MMP-9) dans le plasma sont cohérents avec les schémas d'activation des facteurs de transcription et restent élevés pendant toute la période d'observation de 24 heures. Ces résultats confirment que, in vivo, le retour à la normoxie après une exposition à 30% de FiO<sub>2</sub> est interprété comme un déclencheur hypoxique, se manifestant par l'activation de HIF-1 $\alpha$ . En revanche, 100% et 140% d'oxygène induisent une transition vers une réponse au stress oxydant, caractérisée par l'activation des marqueurs anti-oxydant NRF2 et pro-inflammatoire NF-kB dans les 24 heures suivant l'exposition.

Cependant, des investigations approfondies sont nécessaires pour déterminer si l'hyperoxie aiguë engendre des adaptations réactives compensatoires spécifiques sur des périodes plus longues. C'est pourquoi, les recherches à venir devraient explorer les deux aspects de ce modèle : l'exposition à l'oxygène (en termes de durée et de concentration en oxygène) ainsi que les intervalles de temps entre les sessions d'exposition (expositions intermittentes) [72, 216].

Ce travail s'est concentré sur l'aspect quantitatif de l'oxygène afin de comprendre l'effet des variations de pressions partielles d'oxygène sur les réactions cellulaires chez le sujet sain. Il est composé de 3 parties :

1. L'exposition hypoxique normobare légère et élevé (Mhypo 15% O<sub>2</sub> & Ehypo 10%)
2. L'exposition hyperoxique normobare léger et élevé (Mhyper 30% & Ehyper 100%)
3. L'exposition hyperoxique hyperbare légère et élevé (MHyper 140% & EHyper 250%)

# Matériel et méthodes

## Protocole expérimental

Après avoir donné leur consentement éclairé par écrit, 48 sujets caucasiens non-fumeurs et en bonne santé (32 hommes et 16 femmes) se sont portés volontaires pour cette étude. Aucun d'entre eux ne présentait d'antécédents d'anomalies cardiaques ni ne prenait de médicaments cardio-actifs ou vasoactifs. Toutes les procédures expérimentales ont été menées conformément à la Déclaration d'Helsinki [217] et approuvées par le Comité d'éthique du Comité bioéthique pour la recherche et l'enseignement supérieur, Bruxelles (n° B200-2020-088).

Après un examen médical visant à exclure toute morbidité latente, les participants ont été répartis de manière aléatoire en six groupes de 6 à 8 personnes chacun. Ces groupes ont été divisés en groupes hypoxie normobare [218] (10 % et 15 % de FiO<sub>2</sub>), hyperoxie normobare [209] (30 % et 100 % de FiO<sub>2</sub>) et hyperoxie hyperbare [219] (140 % et 250%). Il a été demandé à tous les participants de s'abstenir de tout exercice physique intense pendant les 48 heures précédant les tests. Aucun nutriment antioxydant (chocolat noir, vin rouge ou thé vert) n'était autorisé 8 heures avant et pendant l'étude. Les sujets ont également été invités à ne pas plonger 48 heures avant l'expérience et à ne pas prendre l'avion dans les 72 heures précédant l'expérience.

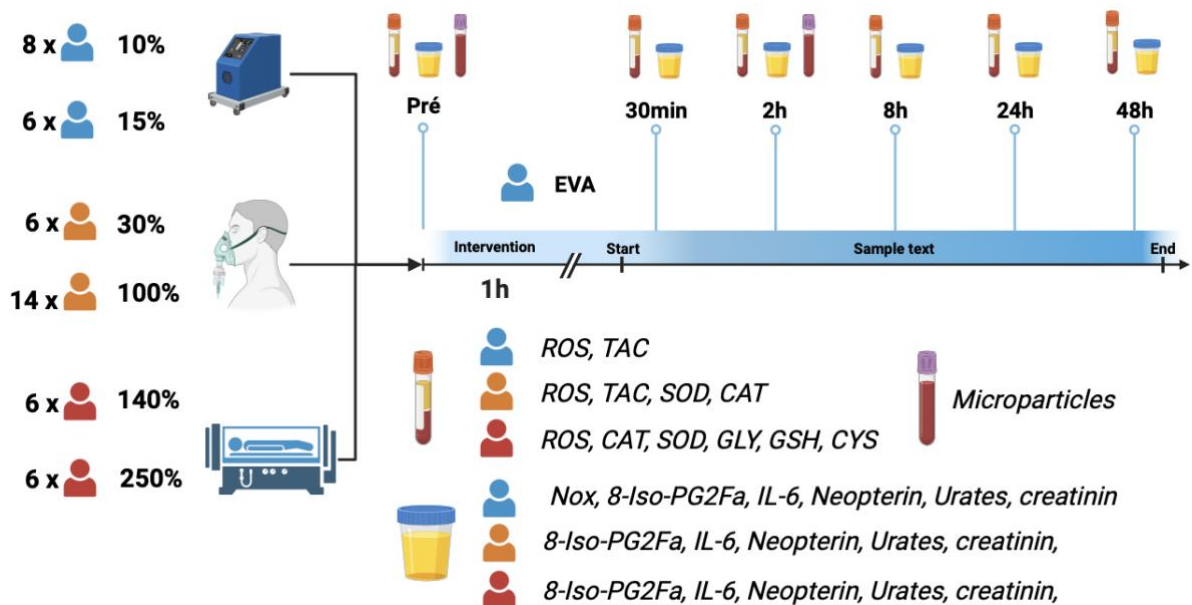


Figure 16 : Organisation du protocole DeltOx.

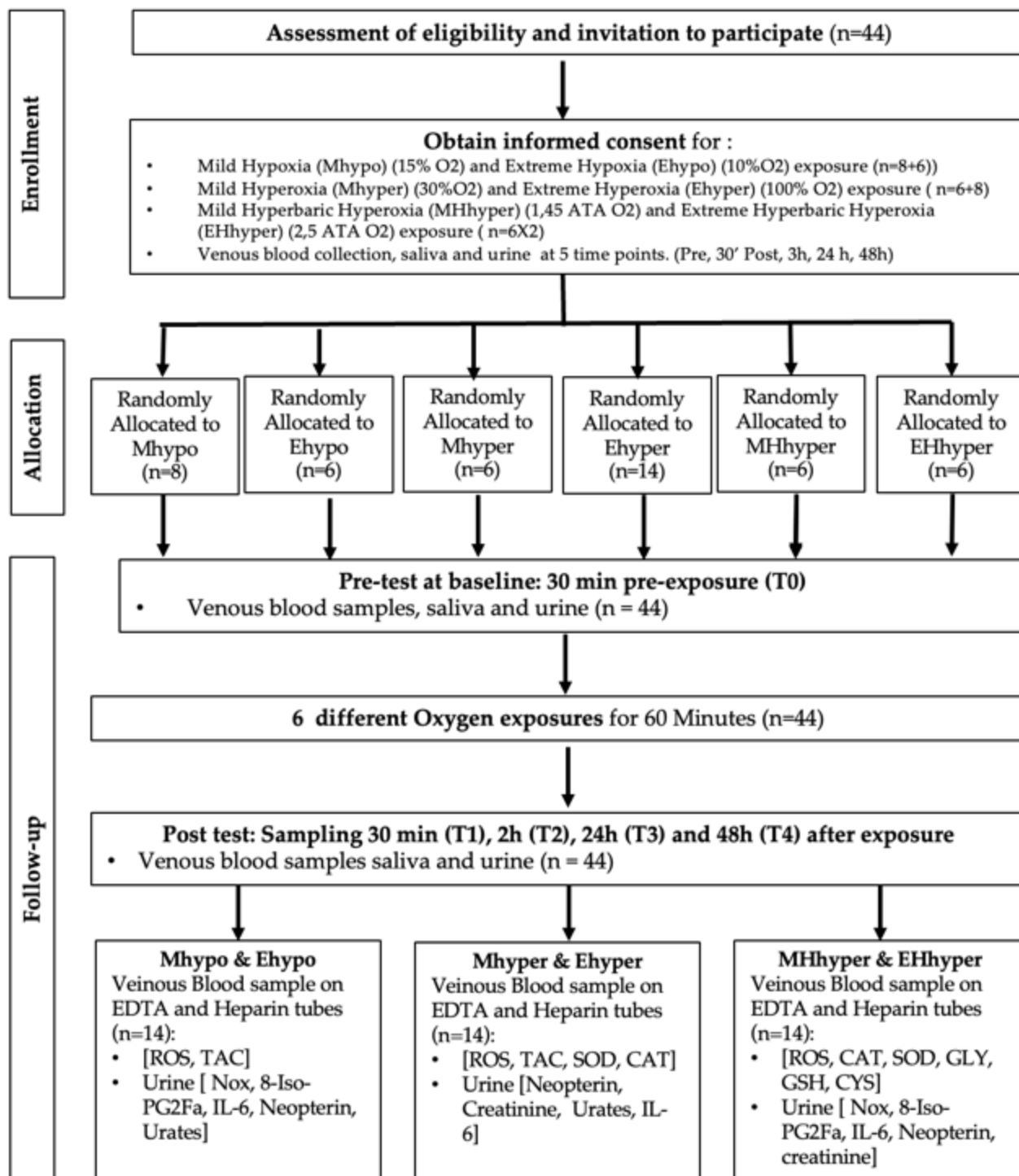


Figure 17. Flowchart expérimentale.

#### Groupe hypoxie normobare (Mhyppo 15% O2 & Ehyppo 10%)

Quatorze participants ont été soumis à des protocoles d'hypoxie légère (15 %, n = 8) et d'hypoxie extrême (10 %, n = 6). En ce qui concerne l'âge (10% : 34,0 ± 13,7 ans (moyenne ± SD) vs. 15 % : 30,9 ± 13,8 ans ; p > 0,05), la taille (10% : 168,2 ± 11,0 cm vs. 15% : 169,9 ± 9,8 cm ; p > 0,05), le poids (10% : 58,7 ± 21,3 kg vs. 15% : 63,8 ± 12,2 kg ; p > 0,05), le rapport des sexes et l'état de santé, les groupes étaient comparables.

De l'air appauvri en oxygène (pression partielle d'oxygène : 0,1 bar ; 100 hPa, n = 6 et 0,15 bar ; 150 hPa, n = 8) a été administré pendant 1 h au moyen d'un masque orofacial avec un sac réservoir, en prenant soin d'ajuster et de serrer le masque sur le visage du sujet.

Le gaz hypoxique aux deux niveaux (10 % et 15 %) a été fourni à l'aide d'un générateur d'hypoxie et réglé pour atteindre le niveau d'oxygène choisi (HYP 123, Hypoxico-Hypoxico Europe GmbH, Bickenbach, Allemagne). Les deux niveaux de débit d'exposition ont été calibrés à l'aide d'un oxymètre (Solo-O2 Divesoft, Halkova, République tchèque) dans le masque utilisé par le sujet afin de s'assurer que le niveau d'oxygène souhaité était atteint.[220]

#### Groupe hyperoxie normobare (Mhyper 30% & Ehyper 100%)

Après un examen médical visant à exclure toute comorbidité, les participants ont été répartis de manière prospective en deux groupes pour recevoir de l'oxygène à différentes FiO2. En ce qui concerne l'âge (29,9 ± 11,1 ans (moyenne ± SD)), la taille (168,2 ± 9,37 cm), le poids (64,4 ± 12,3 kg), l'IMC [22,7 ± 4,1 kg/m<sup>2</sup>], le sexe et l'état de santé, les groupes étaient comparables.

L'oxygène a été administré pendant 1 heure au moyen d'un masque orofacial non respiratoire avec réservoir, en prenant soin d'ajuster et de serrer le masque sur le visage du sujet. Le groupe hyperoxie légère a reçu 30 % d'oxygène (pression partielle d'oxygène (PO2) : 0,3 bar ; 300 hPa, n = 6) à partir d'un réservoir de gaz pressurisé avec un débit de gaz réglé à 10 L/min, tandis que le groupe hyperoxie forte recevait 100 % d'oxygène (PO2 : 1,0 bar, 1000 hPa, n = 8) à partir d'un concentrateur d'oxygène (NewLife Intensity, CAIRE Inc., Ball Ground, GA, USA).

#### Groupe Hyperoxie Hyperbare (MHyper 140% & EHyper 250%)

Quatorze participants ont suivi les protocoles d'hyperoxie hyperbare légère (1,4 ATA, n = 6) et d'hyperoxie hyperbare élevée (2,5 ATA, n = 8). L'âge (1,4 ATA : 36,0 ± 12,3 ans (moyenne ± SD) vs. 2,5 ATA : 38,3 ± 13,6 ans ; p = 0,75), la taille (1,4 ATA : 174,2 ± 13,4 cm vs. 2,5 ATA : 177,9 ± 6,9 cm ; p = 0,51) et le poids (1,4 ATA : 67,7 ± 13,0 kg vs. 2,5 ATA : 81,8 ± 19,0 kg ; p = 0,14) ont été recueillis.

De l'oxygène hyperbare (pression partielle d'oxygène : 1,4 ATA ; 1400 hPa, n = 6, et 2,5 bar ; 2500 hPa, n = 8) a été administré pendant 1 h dans un caisson hyperbare multiplace (Haux-Starmed 2800, Haux-Life-Support GmbH, Karlsbad-Ittersbach, Allemagne) de l'Hôpital militaire de Bruxelles, Belgique, au moyen d'un masque orofacial étanche relié au système de soupape à la demande Haux-Oxymaster. Une durée de 60 minutes a été choisie pour réduire le risque de toxicité de l'oxygène.

Pour chaque groupe, des échantillons de sang et d'urine ont été prélevés avant l'exposition (T0) et 30 minutes, 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures après la fin de l'administration d'oxygène. Le protocole initialement prévu et accepté prévoyait un prélèvement sanguin 8 h après l'exposition ; pour des raisons techniques, cela n'a pas pu être réalisé pour le groupe en hyperoxie hyperbare, mais pour être cohérent avec nos travaux antérieurs et aussi pour mieux représenter la durée du prélèvement, nous avons conservé ce point temporel dans l'axe X des graphiques. Des expériences antérieures ont montré que les réponses cellulaires après différentes expositions oxydatives peuvent se poursuivre pendant 24 heures, voire plus ; nous avons donc décidé de prélever des échantillons de sang jusqu'à 48 heures [71, 73, 201, 221].

Chaque échantillon de sang était constitué d'environ 15 ml de sang humain veineux prélevé dans des tubes à héparine de lithium et EDTA (Vacutainer, BD Diagnostic, Becton Dickinson, Italia S.p.A., Milan, Italie). Le plasma et les globules rouges (GR) ont été séparés par centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702R, Darmstadt, Allemagne) à 1000× g à 4 °C pendant 10 min. Les échantillons de cellules sanguines et de plasma ont ensuite été conservés en plusieurs aliquotes à -80 °C jusqu'à ce qu'ils soient analysés et décongelés ; une analyse a été effectuée dans le mois suivant le prélèvement. L'urine a été recueillie par miction volontaire dans un récipient stérile et conservée en plusieurs aliquotes à -20 °C jusqu'à ce qu'elle soit analysée et décongelée uniquement avant l'analyse.

## Analyse des échantillons sanguins

### Détermination des ROS par résonance paramagnétique électronique (RPE)

Un instrument de résonance paramagnétique électronique (E-Scan-Bruker BioSpin, GmbH, Rheinstetten, Allemagne) en bande X, avec un contrôleur de température à 37 °C interfacé au spectromètre, a été adopté pour le taux de production de ROS, comme déjà réalisé par certains auteurs[222-225]. Les mesures RPE sont hautement reproductibles, comme cela a été démontré précédemment[226] La RPE est la seule technique non invasive adaptée à la mesure directe et quantitative des ROS. En particulier, la technique spectroscopique (EPRS) est utilisée dans de nombreux domaines d'application, y compris la biomédecine[227]. La fiabilité et la reproductibilité des données RPE obtenues à l'aide de la méthode RPE micro-invasive adoptée dans cette étude ont déjà été rapportées précédemment[228].

Brièvement, pour la détection des ROS, 50 µL de plasma ont été traités avec un volume égal de CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine), puis 50 µL de cette solution ont été placés à l'intérieur d'un tube capillaire RPE en verre dans la cavité du spectromètre pour l'acquisition des données. Un radical stable CP (3-Carboxy-2,2,5,5-tétraméthyl-1-pyrrolidinyloxy) a été utilisé comme référence externe pour convertir les valeurs ROS obtenues en valeurs quantitatives absolues (µmol/min). Tous les spectres RPE ont été générés en adoptant le même protocole et obtenus en utilisant un logiciel standard fourni par Bruker (Billerica, MA, USA) (version 2.11, WinEPR System).



## Capacité antioxydante totale

Le dosage de la capacité antioxydante équivalente à l'acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2-carboxylique (Trolox), une méthode commerciale en kit largement utilisée, a été utilisé. Brièvement, 10  $\mu$ L de plasma ont été ajoutés en double à 10  $\mu$ L de méthylglobine et 150  $\mu$ L de la solution de chromogène ; ensuite, les réactions ont été initiées par l'ajout de 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comme indiqué dans les instructions (n° 709001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Les mélanges de réactions ont été incubés à température ambiante pendant 3 minutes, puis lus en mesurant le signal d'absorbance à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques Infinite M200 (Tecan, Grödig, Autriche). Une courbe d'étalonnage linéaire a été calculée à partir des réactions contenant du Trolox pur.

## Superoxide Dismutase (SOD) et Catalase (CAT)

Les niveaux plasmatiques de SOD et de CAT ont été mesurés par dosage immunoenzymatique (kits ELISA) conformément aux instructions du fabricant.

L'activité de la SOD a été évaluée à l'aide du kit de dosage de la SOD de Cayman (706002) qui utilise un sel de tetrazolium pour détecter les radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine.

Une unité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une mutation de 50 % du radical superoxyde, mesurée en variation d'absorbance (450 nm) par minute à 25° et à un pH de 8,0.

L'activité de la CAT a été évaluée à l'aide du kit de dosage Cayman (707002) qui utilise la fonction peroxydante de la CAT. La méthode est basée sur la réaction de l'enzyme avec le méthanol en présence d'une concentration optimale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le formaldéhyde produit est mesuré par colorimétrie avec Purpald (540 nm) comme chromogène. Une unité de CAT est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque la formation de 1 nmol de formaldéhyde par minute à 25°C.

Tous les échantillons et les étalons ont été lus par un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

Les déterminations ont été évaluées en double et le coefficient de variation inter-essais se situait dans la fourchette indiquée par le fabricant.

## Aminothiols totaux (CYS : cystéine ; CYSGLY : cystéinyglycine et GSH : glutathion)

Les aminothiols totaux et réduits (CYS : cystéine ; CYSGLY : cystéinyglycine ; et GSH : glutathion) ont été mesurés dans les érythrocytes (pour le GSH) et le plasma (pour le CYS et le CYSGLY), selon des méthodes validées précédemment [229, 230], à température ambiante par une analyse CLHP isocratique sur une colonne Discovery C-18 (250  $\times$  4,6 mm I.D, Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), éluée avec une solution d'un tampon acétate 0,1 M, pH 4,0 méthanol, 81:19 (v/v), à un débit de 1 mL/min. Les intensités de fluorescence ont été mesurées avec une longueur d'onde d'excitation à 390 nm et une longueur d'onde d'émission à 510 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence (Jasco, Tokyo, Japon). Une courbe d'étalonnage standard a été utilisée pour les échantillons analysés.

## Analyse des échantillons d'urine

### Métabolites de l'oxyde nitrique (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>)

Les concentrations de NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>) ont été déterminées dans l'urine par une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Griess, à l'aide d'un kit commercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), comme décrit précédemment [231]. Les échantillons ont fait l'objet d'une lecture spectrophotométrique à 545 nm.

### 8-Isoprostane (8-Iso-PGF<sub>2</sub>α)

Les niveaux de 8-iso-PGF<sub>2</sub>α ont été mesurés à l'aide d'un kit d'immuno-essai EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) dans l'urine. Il s'agit d'un biomarqueur pour l'évaluation des dommages causés par la peroxydation des lipides. Les échantillons et les étalons ont fait l'objet d'une lecture spectrophotométrique à 412 nm. Les résultats ont été normalisés en fonction des valeurs de la créatinine urinaire.

### Interleukine-6

Les niveaux d'IL-6 ont été déterminés à l'aide du kit ELISA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) basé sur la technique du double anticorps "sandwich", conformément aux instructions du fabricant.

Tous les échantillons et étalons susmentionnés ont été lus à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse). Les déterminations ont été évaluées en double et le coefficient de variation inter-essais se situait dans la fourchette indiquée par le fabricant.

### Concentrations de créatinine, de néoptérine et d'acide urique

Les concentrations urinaires de créatinine, de néoptérine, d'interleukine 6 (IL-6) et d'acide urique ont été mesurées par chromatographie liquide à haute pression (CLHP), comme décrit précédemment [221], à l'aide d'un instrument Varian (pompe 240, échantillonneur automatique ProStar 410, SpectraLab Scientific Inc, Markham, ON, Canada) couplé à un détecteur UV-VIS (Shimadzu SPD 10-AV, λ = 240 nm, SpectraLab Scientific Inc., pour la créatinine et l'acide urique ; et JASCO FP-1520, λ<sub>ex</sub> = 355 nm et à λ<sub>em</sub> = 450 nm, SpectraLab Scientific Inc., pour la néoptérine).

Après centrifugation de l'urine à 1500× g à 4 °C pendant 5 min, les procédures de séparation analytique ont été effectuées à 50 °C sur une colonne analytique Discovery C18 de 5 μm (250 × 4,6 mm I.D., Supelco, Sigma-Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milano, Italie) à un débit de 0,9 mL/min. Les courbes d'étalonnage étaient linéaires sur la plage de 0,125-1 μmol/L, 0,625-20 mmol/L et 1,25-10 mmol/L pour les taux de néoptérine, d'acide urique et de créatinine, respectivement. Les coefficients de variation inter-essais et intra-essais étaient <5%.

## Échelle visuelle analogique (EVA)

L'humeur subjective, le bien-être général/malaise, le repos/la fatigue, les maux de tête, le sommeil et les nausées ont été évalués à l'aide d'une échelle visuelle analogique (EVA) de 0 à 100 mm. Ce système de notation a déjà été suggéré pour évaluer l'inconfort et/ou le malaise général[232]. Compte tenu de son utilité pour d'autres évaluations cliniques, l'EVA a été jugée appropriée pour tester la perception subjective des effets de l'hypoxie normobare[233, 234].

## Analyse statistique

### Hypoxie normobare

La normalité des résultats a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entre les résultats à différents moments et la ligne de base ont été effectuées à l'aide de tests ANOVA à une voie à mesures répétées lorsque les résultats avaient une distribution gaussienne. Dans le cas contraire, un test de Friedman a été appliqué. Les comparaisons entre les groupes exposés à 10 % et 15 % ont été effectuées à l'aide d'un test t non apparié (paramétrique) ou d'un test de Mann-Whitney (non paramétrique). Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (ET). Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide d'un logiciel statistique standard, GraphPad Prism version 9.5.1. pour PC (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un seuil de  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif. La taille de l'échantillon nécessaire pour une analyse de variance à mesures répétées (Friedman) a été calculée à l'aide du logiciel G\*power calculator 3.1.9.7 (Heinrich-Heine- Universität, Düsseldorf, Allemagne) (taille de l'effet = 0,65, erreur alpha = 0,05, puissance = 0,80), et le nombre de participants requis pour cette étude était de six dans chaque groupe, ce qui correspond à des études antérieures[209].

### Hyperoxie normobare

La normalité des données a été vérifiée au moyen du test de Shapiro-Wilk, qui nous a permis de supposer une distribution gaussienne. Par rapport à la ligne de base (T0-pré-exposition), les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à sens unique pour les mesures répétées, avec un test post hoc de Dunnett pour les comparaisons intragroupes. Un test t non apparié a été utilisé pour les comparaisons entre groupes. En prenant les mesures de base comme 100% (T0), les changements en pourcentage ou en pli ont été calculés pour chaque protocole d'oxygène, ce qui permet d'apprécier l'ampleur du changement plutôt que les valeurs absolues. Toutes les données ont été présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (ET).

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide d'un logiciel statistique standard, GraphPad Prism version 9.00 pour Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Un seuil de  $p < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

## Hyperoxie hyperbare

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 10 pour Mac (La Jolla, CA, USA). Les données sont exprimées en pourcentage des valeurs avant exposition. En prenant les mesures de base comme 100%, le pourcentage ou les changements de pli ont été calculés pour chaque temps de mesure, ce qui permet d'apprécier l'ampleur du changement plutôt que les valeurs absolues. La différence entre le pourcentage des valeurs avant exposition et 100 % a été comparée par un test t bilatéral à un échantillon lorsque la normalité de l'échantillon était atteinte, telle qu'évaluée par les tests de d'Agostino et de Pearson. Dans le cas contraire, le test non paramétrique de la somme des rangs de Wilcoxon a été utilisé. Les comparaisons entre les groupes 1,4 ATA et 2,5 ATA ont été effectuées à l'aide du test t non apparié (paramétrique) ou du test de Mann-Whitney (non paramétrique). Parallèlement, pour évaluer les différences dans les valeurs de base entre les conditions, une ANOVA à deux voies a été réalisée avec la pression d'oxygène (1,4 ATA et 2,5 ATA) et le temps après l'exposition. Lorsque la sphéricité n'était pas supposée, les effets principaux et les interactions de l'analyse de la variance (ANOVA) ont été interprétés avec la correction de Greenhouse-Geisser. Les comparaisons multiples corrigées par Sidak ont été utilisées pour analyser les interactions et les effets principaux significatifs. Le niveau alpha a été fixé à 0,05. Les données sont présentées sous forme de moyenne (M) ± écart-type (ET). Le niveau de signification a été fixé à  $p < 0,05$ . La taille de l'échantillon requise pour une analyse de variance à mesures répétées a été calculée à l'aide du logiciel G\*power calculator 3.1.9.7 (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Allemagne) (taille de l'effet = 0,65, erreur alpha = 0,05, puissance = 0,80), et le nombre requis de participants pour cette étude était de 6 dans chaque groupe, ce qui correspond à des études antérieures[209].

# Résultats

## Cinétique de réponse au stress oxydant après 60 minutes à différents niveaux (10 % ou 15 %) d'exposition à l'hypoxie normobare

### Résumé :

L'hypoxie aiguë (HA) est courante chez les travailleurs en altitude et les pilotes. Les protocoles d'HA intermittents à faible dose offrent des avantages, mais les effets à long terme nécessitent une compréhension approfondie. Des variations d'oxygène inspiré peuvent influencer des marqueurs comme l'hémoglobine et l'IL-6. L'incorporation de l'hypoxie dans l'entraînement intense a des effets variables sur la performance. Les ROS générées par une exposition sévère peuvent faciliter la progression de maladies, tandis qu'un programme d'exposition intermittente gagne en popularité comme traitement. Le meilleur protocole pour une exposition aiguë n'est pas clair. La cinétique des réponses cellulaires à l'hypoxie doit être comprise avant d'appliquer des séances intermittentes. Cette étude vise à observer les des réponses cellulaires après une exposition unique à des fractions d'oxygène de 10% et 15%.

14 sujets non-fumeurs en bonne santé (6 femmes et 8 hommes, âge :  $32,2 \pm 13,3$  ans (moyenne  $\pm$  écart-type), taille :  $169,1 \pm 9,9$  cm et poids :  $61,6 \pm 16,2$  kg) se sont portés volontaires pour l'étude. Des échantillons de sang ont été prélevés avant et 30 min, 2 h, 8 h, 24 h et 48 h après une exposition hypoxique d'une heure. Le niveau de stress oxydatif a été évalué en considérant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les métabolites de l'oxyde nitrique (NOx), la peroxydation lipidique et l'inflammation immunitaire par l'interleukine-6 (IL-6) et la néoptérine, tandis que les systèmes antioxydants ont été observés en termes de la capacité antioxydante totale (TAC) et les urates.

Les données présentées confirment une augmentation significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors d'une hypoxie modérée ou extrême sur une courte période, corroborant des études antérieures. L'augmentation de la production de ROS est plus rapide et plus importante avec l'augmentation de l'hypoxie, mais les niveaux reviennent près de la ligne de base après 48 heures de récupération. L'inhibition du complexe I mitochondrial par l'hypoxie intermittente active le NOx (NADPH oxydase), augmentant ainsi la production de ROS. Une augmentation de la production de NOx, en particulier après 2 heures, indique une activité précoce du NO en tant que capteur de ROS.

Une diminution de l'excrétion urinaire de l'acide urique (UA) après une respiration à 15% d'oxygène suggère une consommation d'UA comme antioxydant. L'UA agit efficacement comme un éliminateur de radicaux libres. L'augmentation de l'excrétion de créatinine suggère une augmentation du catabolisme de la créatine, qui pourrait agir comme un protecteur mitochondrial. L'initiation de 8-iso-PGF $2\alpha$ , un marqueur de la peroxydation lipidique par les ERO, a été observée à 2 heures. Une stimulation du système immunitaire a été constatée avec une augmentation de la néoptérine, réagissant rapidement après le pic de ROS.

Toutes les contre-mesures rénales semblent avoir un rôle antioxydant efficace lors d'expositions hypoxiques courtes. L'hypoxie aiguë stimule la production d'IL-6 et la polarisation des macrophages M1, activant la voie de signalisation NRF2 pour maintenir l'homéostasie redox. Ces résultats suggèrent des mécanismes adaptatifs bénéfiques lors d'expositions hypoxiques courtes.

Article

# Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different Levels (10% or 15%) of Normobaric Hypoxia Exposure

Clément Leveque <sup>1,2</sup>, Simona Mrakic Sposta <sup>3</sup>, Sigrid Theunissen <sup>1,\*</sup>, Peter Germonpré <sup>4,5</sup>, Kate Lambrechts <sup>1</sup>, Alessandra Vezzoli <sup>3</sup>, Maristella Gussoni <sup>6</sup>, Morgan Levenez <sup>1</sup>, Pierre Lafère <sup>1,4</sup>, François Guerrero <sup>2</sup> and Costantino Balestra <sup>1,4,7,8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Environmental, Occupational, Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), 1160 Brussels, Belgium; c.leveque.research@gmail.com (C.L.); klambrechts@he2b.be (K.L.); morganlevenez@gmail.com (M.L.); plafer@he2b.be (P.L.)
  - <sup>2</sup> Laboratoire ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 93837 Brest, France; francois.guerrero@univ-brest.fr
  - <sup>3</sup> Institute of Clinical Physiology, National Research Council (CNR), 20162 Milan, Italy; simona.mrakicsposta@cnr.it (S.M.S.); alessandra.vezzoli@cnr.it (A.V.)
  - <sup>4</sup> DAN Europe Research Division (Roseto-Brussels), 1160 Brussels, Belgium; pgermonpre@gmail.com
  - <sup>5</sup> Hyperbaric Centre, Queen Astrid Military Hospital, 1120 Brussels, Belgium
  - <sup>6</sup> Institute of Chemical Sciences and Technologies “G. Natta”, National Research Council (SCITEC-CNR), 20133 Milan, Italy; maristella.gussoni@unimi.it
  - <sup>7</sup> Anatomical Research and Clinical Studies, Vrije Universiteit Brussels (VUB), 1090 Brussels, Belgium
  - <sup>8</sup> Motor Sciences Department, Physical Activity Teaching Unit, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium
- \* Correspondence: sigtheunissen@gmail.com (S.T.); costantino.balestra@ulb.be (C.B.)



**Citation:** Leveque, C.; Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Gussoni, M.; Levenez, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different Levels (10% or 15%) of Normobaric Hypoxia Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10188. <https://doi.org/10.3390/ijms241210188>

Academic Editors: Nam Deuk Kim and Luc Rochette

Received: 16 May 2023  
Revised: 13 June 2023  
Accepted: 13 June 2023  
Published: 15 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In this study, the metabolic responses of hypoxic breathing for 1 h to inspired fractions of 10% and 15% oxygen were investigated. To this end, 14 healthy nonsmoking subjects (6 females and 8 males, age:  $32.2 \pm 13.3$  years old (mean  $\pm$  SD), height:  $169.1 \pm 9.9$  cm, and weight:  $61.6 \pm 16.2$  kg) volunteered for the study. Blood samples were taken before, and at 30 min, 2 h, 8 h, 24 h, and 48 h after a 1 h hypoxic exposure. The level of oxidative stress was evaluated by considering reactive oxygen species (ROS), nitric oxide metabolites (NOx), lipid peroxidation, and immune-inflammation by interleukin-6 (IL-6) and neopterin, while antioxidant systems were observed in terms of the total antioxidant capacity (TAC) and urates. Hypoxia abruptly and rapidly increased ROS, while TAC showed a U-shape pattern, with a nadir between 30 min and 2 h. The regulation of ROS and NOx could be explained by the antioxidant action of uric acid and creatinine. The kinetics of ROS allowed for the stimulation of the immune system translated by an increase in neopterin, IL-6, and NOx. This study provides insights into the mechanisms through which acute hypoxia affects various bodily functions and how the body sets up the protective mechanisms to maintain redox homeostasis in response to oxidative stress.

**Keywords:** hypoxia; oxygen biology; cellular reactions; human; oxygen therapy; human performance; decompression

## 1. Introduction

Acute hypoxia (AH) is an environmental condition that is regularly encountered, for example, by mine workers or telescope operators going to high altitudes, or by pilots flying at high altitudes [1]. Intermittent acute hypoxia is also a therapeutic approach that is of growing interest in scientific research because of its (often unrecognized) beneficial effects, as well as its adverse effects. Indeed, low-dose repetitive AH protocols have demonstrated numerous benefits, such as reducing hypertension [2], reducing inflammation [3], improving aerobic capacity [4], increasing bone mineral density [5], and improving memory [6–9] and cardiovascular function [10,11]. Furthermore, the positive effects of low-dose AH

do not seem to be associated with detectable negative effects, such as systemic inflammation [12]. However, in order to optimize the use of AH as a therapeutic approach, it is important to maximize its benefits while avoiding any adverse effects. Hypoxia can have deleterious effects during stroke or cancer [13] and may negatively affect vascular function [14] or even cause altitude sickness in healthy mountaineers [15]. Of course, these harmful effects generally result from oxygen deprivation at lower oxygen fractions or for longer periods [16].

At the same time, it has been shown that intermittent variations in the inspired oxygen level, whether to hypoxia or hyperoxia, can also lead to multiple effects such as an increase in hemoglobin [17] or the stimulation of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ , inflammatory markers such as nuclear factor kappa B and interleukin-6 (IL-6), antioxidant proteins as nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2) and micro-RNAs [18].

Some authors have attempted to use hypoxia during training sessions to achieve an increased training benefit [19,20] by coupling high-intensity exercise sessions with simulated altitude. However, incorporating hypoxia into all high-intensity interval sessions had little effect on performance compared with normoxia training [21,22]. Other studies suggest that short-term exposure to hypoxic air during intense training can favorably remodel skeletal muscle [23–25]. However, there is no visible benefit to endurance performance, particularly in well-trained athletes [26].

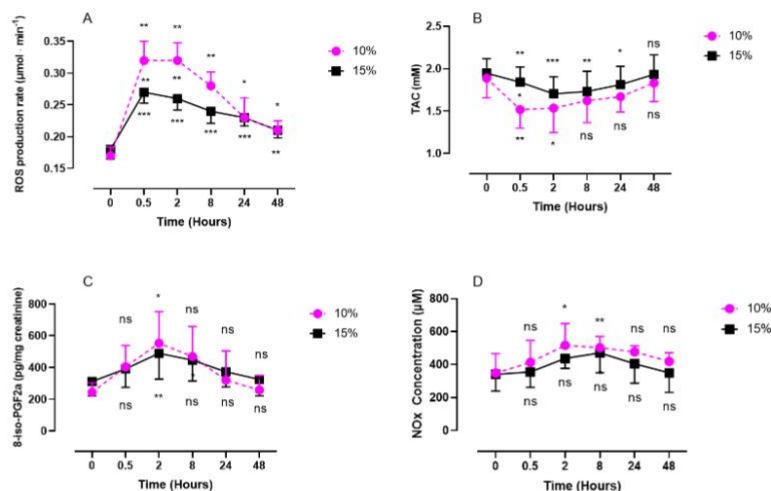
It is known that reactive oxygen species (ROS) and the cellular redox state play a major role in modulating many signaling pathways. In moderate amounts, ROS are important for physiological processes, leading to positive cellular adaptive responses, while large amounts of ROS can damage lipids, proteins, and DNA, and lead to pathological responses [18]. Therefore, the exposure of healthy individuals or patients to severe hypoxia could potentially generate high levels of ROS and facilitate disease progression [27]. In contrast, a training program consisting of 15 to 24 sessions of intermittent exposure to severe hypoxia has gained popularity as a treatment in patients with a variety of chronic conditions [28–30]. Currently, the best protocol for acute exposure to severe hypoxia (in combination with normoxia or hyperoxia) to reach the best outcomes associated with a beneficial change in the redox status is not known [16,31,32]. Depending on the duration and severity of the hypoxia exposure, the effects on the different cellular functions can be positive or deleterious. It is therefore important to understand its kinetics after a single exposure before implementing intermittent hypoxia sessions for patient treatment or for training reasons, since the time between sessions is crucial to achieve optimal outcomes and different cell reactions could be targeted depending on the dose and repetitions [33,34]. The objective of this study is thus to observe the effects of oxy-inflammation over time in response to a single exposure to normobaric hypoxia at two different inspired fractions of oxygen (FiO<sub>2</sub>): 10% and 15%.

## 2. Results

### 2.1. ROS and NOx Rate, Antioxidant Response (TAC), and 8-Isoprostane (8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) Levels after One Hour of Oxygen Exposure at an FiO<sub>2</sub> of 10% and 15%

Both levels of oxygen exposure, severe (10%) and mild (15%), elicited a significant increase in plasmatic ROS production rate, with a steeper increase and slower reduction for severe exposure (Figure 1A). Exposure to severe hypoxia produced more ROS than mild exposure and showed a pattern characterized by a significant increase, with a peak after 30 min for both 10% hypoxia ( $0.32 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  compared with baseline;  $p = 0.0015$ ; size effect = 0.16) and 15% hypoxia ( $0.27 \pm 0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $p < 0.001$ ; size effect = 0.24). This peak plateaus for about 2 h quantity of ROS decreases slowly until 48 h. The difference between the two levels of exposure disappeared after 24 h ( $p = 0.87$ ). The antioxidants (TAC) (Figure 1B) decreased, with a nadir at 30 min for the 10% FiO<sub>2</sub> group ( $1.52 \pm 0.22 \text{ mM}$ ;  $p = 0.0017$ ; size effect = 0.50) and at 2 h for the 15% FiO<sub>2</sub> group ( $1.70 \pm 0.20 \text{ mM}$ ;  $p = 0.0010$ ; effect size = 0.2496). Antioxidants decreased more rapidly after severe hypoxia than after mild hypoxia ( $p = 0.0191$ ). Notably, 8-isoprostane (pg/mg creati-

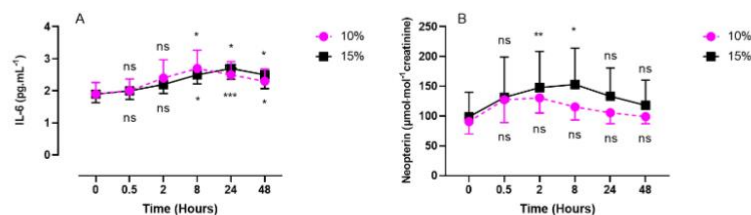
nine) (Figure 1C) followed the exact same trend for both levels of oxygen exposure, with a peak at 2 h ( $553 \pm 199 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine after 10% hypoxia;  $p = 0.0461$ ; size effect = 0.64 vs.  $489 \pm 161 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine after 15% hypoxia;  $p = 0.0046$ ; size effect = 0.35). After 48 h, the values returned to baseline for both levels of exposure (10%:  $259 \pm 91 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine;  $p = 0.4499$  and 15%:  $325 \pm 103 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine;  $p > 0.9999$ ). Nitric oxide metabolites (Figure 1D) showed a peak 2 h after acute exposure to 10% oxygen compared with baseline ( $516 \pm 132 \text{ }\mu\text{M}$ ;  $p = 0.013$ ; size effect = 0.51), while no significant difference was observed after exposure to 15% oxygen ( $p = 0.1303$ ; size effect = 0.27).



**Figure 1.** Evolution of ROS production rate (A), antioxidant response (TAC) (B), 8-iso-PGF2a (C), and NOx (D) after 60 min of mild (15%,  $n = 8$ ) or severe hypoxia (10%,  $n = 6$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents the pre-exposure baseline. Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 10% and 15% of oxygen exposure when significant are shown between the two curves (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

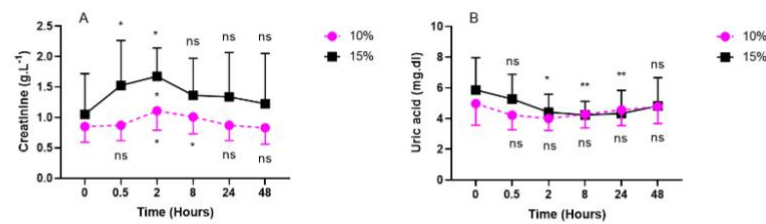
## 2.2. Inflammatory Response (IL-6, Neopterin, Creatinine, and Uric Acid) after One Hour of Oxygen Exposure at an $\text{FiO}_2$ of 10% or 15%

Interleukin 6 (IL-6) was measured in plasma samples while neopterin, creatinine, and urates were obtained from urine samples (Figures 2 and 3).



**Figure 2.** Evolution of the inflammatory response after 60 min of mild (15%,  $n = 8$ ) or severe hypoxia (10%,  $n = 6$ ) for interleukin-6 (IL-6) (A) and neopterin (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents pre-exposure values. Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).





**Figure 3.** Evolution of urinary markers after 60 min of mild (15%,  $n = 8$ ) or severe hypoxia (10%,  $n = 6$ ) for creatinine (A) and uric acid (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents pre-exposure values. Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 10% and 15% of oxygen exposure when significant are shown between the two curves (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; intragroup: Friedman; intergroup: unpaired  $t$ -test).

IL-6 showed a significant increase compared with the baseline, until reaching its peak at 8 h for the 10% group ( $2.7 \pm 0.57$  pg/mL;  $p = 0.0203$ ; effect size = 0.72). Contrary to severe hypoxia, mild hypoxia (15%) showed a significant increase from 8 h post-exposure ( $2.5 \pm 0.28$  pg/mL;  $p = 0.0179$ ), with a peak at 24 h ( $2.7 \pm 0.34$  pg/mL;  $p = 0.0001$ ), and slowly decreased until 48 h.

Neopterin showed a similar trend during the first 30 min for mild (15%) and severe (10%) hypoxia and reached its peak at 2 h for severe hypoxia ( $130.6 \pm 25.6$   $\mu$ mol/mol creatinine;  $p = 0.1475$ ; effect size = 0.52) and at 8 h for mild hypoxia ( $153.0 \pm 61.1$   $\mu$ mol/mol creatinine;  $p = 0.0441$ ; effect size = 0.13). The values returned to baseline after 48 h for the two levels of hypoxia.

Compared with the baseline, creatinine and urates in urine exhibited an opposite U-shaped response, with creatinine's acme at 2 h post-exposure (10%:  $1.11 \pm 0.32$  g/L;  $p = 0.0192$ ; effect size = 0.17 vs. 15%:  $1.68 \pm 0.47$  g/L;  $p = 0.0488$ ; effect size = 0.10) and urates' nadir between 30 min and 2 h for severe hypoxia (10%) (30 min:  $4.22 \pm 0.96$  mg/dL;  $p = 0.3312$ ; 2 h:  $4.0 \pm 0.78$  mg/dL;  $p = 0.3427$ ; effect size = 0.13) and between 8 h and 24 h for mild hypoxia (15%) (8 h:  $4.23 \pm 0.89$  mg/dL;  $p = 0.0041$ ; 24 h:  $4.33 \pm 1.5$  mg/dL;  $p = 0.0084$ ; size effect = 0.18) (Figure 3).

### 2.3. Discomfort Perceived—Visual Analog Scale (VAS)

No subject developed malaise, tiredness, headaches, sleepiness, or nausea upon exposure to one hour of hypoxia, neither with 10% nor with 15% exposure. However, hypoxia at 10% (equivalent to an altitude of approximately 5700 m) was felt to be less comfortable than that at 15% (roughly 2500 m altitude) ( $81.0 \pm 10.6\%$  of declared discomfort vs.  $12.9 \pm 5.4\%$  of declared discomfort, respectively;  $p > 0.001$ ).

### 3. Discussion

The presented data confirm the results of previous studies by highlighting a significant increase in ROS production [35–38] during a short period of moderate or extreme hypoxia. We observed a faster and larger increase in ROS production as hypoxia increased. However, after 48 h of recovery, ROS levels returned close to the baseline. It is known that the mitochondrial complex I is inhibited by intermittent hypoxia through the activation of NOx (NADPH oxidase), thereby increasing the production of ROS [39]. In various situations, electrons escaping from enzymatic and nonenzymatic reactions initiate the production of ROS, represented by superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxide ( $HO^{\bullet}$ ) [40]. In an aqueous solution,  $O_2^{\bullet-}$  has a half-life of approximately 4  $\mu$ sec, which gives it the ability to scatter over a distance ranging from 150 to 220 nm [41,42]. Thus,  $O_2^{\bullet-}$  can react at various locations beyond where it is generated and, as a result, can affect surrounding molecules and organelles more extensively than  $HO^{\bullet}$ . However, this distance is insufficient for extracellularly produced  $O_2^{\bullet-}$  to move within a cell. Therefore,  $O_2^{\bullet-}$

generated inside the cell has the ability to damage various cellular components, including DNA, organelles, and cellular membranes' phospholipids. Our results are in agreement with this assumption since we observed an increase in 8-iso-PGF2 $\alpha$  2 h after the two levels of exposure, slightly delayed after the increase in ROS occurring 30 min after exposure.

It has been demonstrated that acute hypoxic conditions induce mitochondrial fission [43]. This reduction in mitochondrial fusion is further described in hypoxia-reoxygenation situations and is caused by decreased ATP production [44]. This adaptation appears to be a countermeasure to maintaining mitochondrial ROS production at a balanced level [45]. Furthermore, we observed an increase in NOx production, with a peak after 2 h and still significant after 8 h. Due to its radical nature, the reaction between superoxide and NO proceeds in a limited manner through diffusion (with a rate constant of  $k = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [46], which is faster than the SOD-catalyzed dismutation of superoxide. The advantage of trapping superoxide ions is to eliminate the radical electrons at an early stage, thereby halting subsequent radical chain reactions [40]. Indeed, our results suggest that the peak of NOx at 2 h occurring after the peak of ROS (30 min) indicates an early activity of NO as a ROS scavenger. This is further confirmed by the nonsignificant changes in NOx during normobaric hypoxia. This is consistent with previous findings [35], where the activity of GPX and SOD was not significantly increased after normobaric hypoxia [47]. Considering the abundant production of NO, the ability of NO to scavenge superoxide appears to be comparable to the activity of intracellular SOD and may even be more effective. However, the resulting ONOO $^-$  produced from this reaction is a powerful oxidant and is toxic to cells when produced in excess beyond the antioxidant capacity [48]. However, currently, new lines of evidence suggest a beneficial action of ONOO $^-$ . In the vascular system, for instance, moderate levels of ONOO $^-$  appear to stimulate prostaglandin synthesis and play a role in cellular signal transduction reactions [49]. Furthermore, under inflammatory conditions, the simultaneous production of NO and ONOO $^-$  suggests that the detoxification of superoxide by NO exceeds the cytotoxic action of ONOO $^-$  [50].

Although H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not directly measured, we hypothesize that the increase in NOx, in particular NO<sub>2</sub>, may reflect the onset of an adaptive activity by angiogenesis [51].

In this study, we observed a decrease in urinary uric acid (UA) excretion, more clearly expressed after 15% of oxygen breathing. This suggests a consumption of uric acid as an antioxidant.

In fact, an evolutionary advantage of UA has been proposed by demonstrating its strong capacity to eliminate free radicals, making it an excellent scavenger [52]. Studies have shown that UA contributes up to 60% to the elimination of free radicals in human serum [53]. Furthermore, the systemic administration of UA has been associated with an increase in plasma antioxidant capacity, both at rest and after exercise, in healthy subjects [54,55]. Interestingly, after 48 h, we observed a return to baseline levels, suggesting that UA plays an antioxidant role without shifting to its function as a pro-oxidant [56].

Moreover, we observed an increase in urinary creatinine excretion, with a zenith 2 h after exposure to 10% and 15% hypoxia. This suggests an increase in creatine catabolism. Although the antioxidant mechanism of creatine is not yet fully understood, it has been shown to contribute to cellular homeostasis, particularly as a mitochondrial protector [57].

In our experimental setting, no muscular activity was present. Therefore, we believe creatinine excretion is a marker of its antioxidant activity. In fact, it is known that, in response to acute high-altitude exposures with muscular activity, hyperventilation causes alkalosis. The kidneys compensate for this alkalosis by excreting excess bicarbonate and retaining hydrogen ions to reduce respiratory alkalosis [58]. Our results are then in agreement with the putative (not yet fully known) mechanism of action of creatine as an antioxidant. However, it has been shown to increase the activity of antioxidant enzymes and the capability to eliminate ROS and reactive nitrogen species [59–61]. We indeed found a globally symmetrical reaction to creatinine on ROS production, NOx, neopterin, and 8-iso-PGF2 $\alpha$ .

Interestingly, we observed an increase in the initiation of 8-iso-PGF2 $\alpha$ , which is a marker of lipid peroxidation by ROS [62,63], at 2 h post-exposure. Lipid peroxidation has

its peak between 2 and 8 h; this relatively late reaction may be understood because of creatin action (cf. supra).

Our study also showed an immune system stimulation. Indeed, the increasing concentration of neopterin can be monitored in medicine to evaluate the level of clinical inflammation resulting from physical trauma, cardiovascular diseases, cancer, and bacterial, parasitic, and/or viral infections [64–68]. A rapid increase in neopterin was also observed (after 2 h) following the ROS peak without pathological reasons since the hypoxic stimulus was of short duration and no other harmful situations (trauma, cardiovascular diseases, etc.) were present. This rapid reaction is of interest, as it would counteract the inflammasome complex favoring the NRF2 pathway, as already shown following mild “oxy-inflammation” of 60 min [69]. This result is very interesting in the context of preconditioning protocols with the aim of inhibiting inflammasomes [70].

Interestingly, neopterin modulation is inversely proportional to the importance of hypoxia. Indeed, we observed a greater increase in neopterin after exposure to 15% oxygen than after exposure to 10% oxygen. We speculate that a higher hyperoxia-induced increase in ROS production could contribute to this difference, as already recently shown in moderate hyperoxia compared with hypoxia (oxy-inflammation) [14].

All the renal countermeasures described seem to have an efficient antioxidant role in these short hypoxic exposures together with significant TAC variations. This was not found during longer hypoxic exposures [71].

Acute hypoxia stimulates the production of IL-6 and the polarization of M1 macrophages. IL-6 is increased via the induction of antioxidant response element and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [72]. Furthermore, IL-6 (staying significantly high for 48 h) activates the NRF2 signaling pathway, which allows for the expression of antioxidant genes and maintains redox homeostasis [73]. Furthermore, it has recently been shown that NRF2 plays a key role in providing the preconditions for normobaric hypoxia to enhance exercise endurance [74].

#### 4. Limitations

Strengths:

- This study is, to our knowledge, one of the first to tackle the kinetic responses to a single short normobaric oxygen exposure at 10% and 15% of FiO<sub>2</sub>;
- The measurements were taken until 48 h post-exposure and putatively open the avenue to new possible applications for hypoxic protocols;
- The electron paramagnetic resonance (EPR) method used for ROS analysis is the actual gold standard.

Weaknesses:

- The number of subjects was limited, but the sample can be considered homogenous since all were healthy participants;
- The analysis was not carried out in the nucleus of the cells but in the plasma. This could be considered a weakness for some, but it would need a thoroughly different experimental setting.

#### 5. Materials and Methods

##### 5.1. Experimental Protocol

After written informed consent, 48 healthy nonsmoking Caucasian subjects (32 males and 16 females) volunteered for this study. None of them had a history of previous cardiac abnormalities or were under any cardio- or vasoactive medication.

All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [75] and approved by the Ethics Committee approval from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (No. B200-2020-088).

After medical screening to exclude any latent morbidity, participants were prospectively randomized into six groups of 6–8 persons each. These groups were divided into hypoxia (10% and 15% of FiO<sub>2</sub>), normobaric hyperoxia (30% and 100% of FiO<sub>2</sub> [34], and

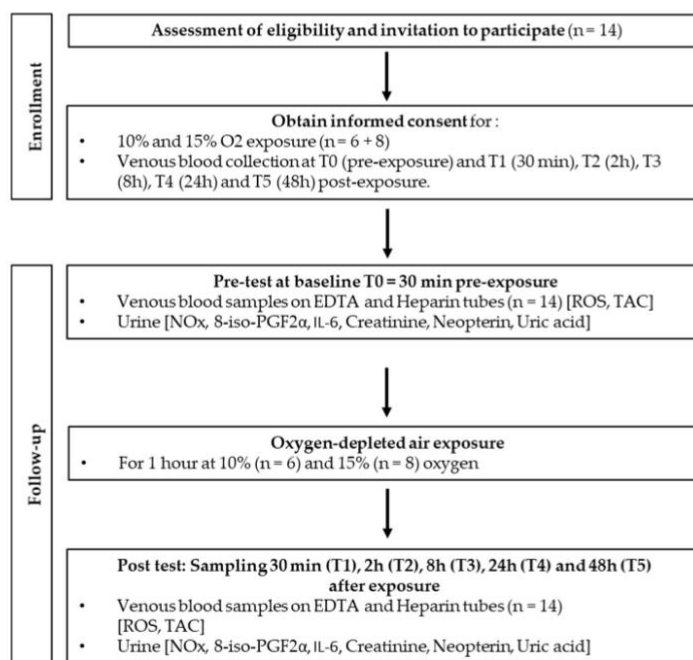
hyperbaric hyperoxia (1.4 ATA and 2.5 ATA) groups. All participants were asked to refrain from strenuous exercise for 48 h before the tests. No antioxidant nutrients, i.e., dark chocolate, red wine, or green tea, were permitted 8 h preceding and during the study. The subjects were also asked not to dive 48 h before the experiment and not to fly within 72 h before the experiment.

Fourteen participants were subjected to mild hypoxia (15%,  $n = 8$ ) and extreme hypoxia (10%,  $n = 6$ ) protocols. As far as age (10%:  $34.0 \pm 13.7$  years old (mean  $\pm$  SD) vs. 15%:  $30.9 \pm 13.8$  years old;  $p > 0.05$ ), height (10%:  $168.2 \pm 11.0$  cm vs. 15%:  $169.9 \pm 9.8$  cm;  $p > 0.05$ ), weight (10%:  $58.7 \pm 21.3$  kg vs. 15%:  $63.8 \pm 12.2$  kg;  $p > 0.05$ ), gender ratio, and health status are concerned, groups were comparable.

Oxygen-depleted air (oxygen partial pressure: 0.1 bar; 100 hPa,  $n = 6$  and 0.15 bar; 150 hPa,  $n = 8$ ) was administered for 1 h by means of an orofacial nonbreather mask with a reservoir bag, care being taken to fit and tighten the mask on the subject's face.

Hypoxic gas at the two levels (10% and 15%) was supplied using a hypoxia generator and set to reach the chosen level of oxygen (HYP 123, Hypoxico–Hypoxico Europe GmbH, Bickenbach, Germany). Both levels of exposure flow were calibrated by means of an oximeter (Solo-O<sub>2</sub> Divesoft, Halkova, Czech Republic) in the mask used by the subject to ascertain that the desired oxygen level was reached [34].

Blood and urine samples were obtained before exposure (T0) and 30 min, 2 h, 8 h, 24 h, and 48 h after the end of oxygen administration (Figure 4). Previous experiments have shown that cellular responses after different oxidative exposures may take up to 24 h or even more. Therefore, we decided to take blood samples up to 48 h [14,18,69,76].



**Figure 4.** Experimental flowchart.

Each blood sample consisted of approximately 15 mL of venous human blood collected in lithium heparin and EDTA tubes (Vacutainer, BD Diagnostic, Becton Dickinson, Italia S.p.a., Florence, Italy). Plasma and red blood cells (RBCs) were separated via centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702R, Darmstadt Germany) at  $1000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The

samples were then stored in multiple aliquots at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed; analysis was performed within one month of sample collection.

Urine was collected by voluntary voiding in a sterile container and stored in multiple aliquots at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until assayed and thawed only before analysis.

## 5.2. Blood Sample Analysis

### 5.2.1. Determination of ROS Using Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

An electron paramagnetic resonance instrument (E-Scan—Bruker BioSpin, GmbH, Rheinstetten, Germany) X-band, with a controller temperature at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  interfaced to the spectrometer, was adopted for ROS production rate, as already performed by some of the authors [77–80]. EPR measurements are highly reproducible, as previously demonstrated [81]. EPR is the only noninvasive technique suitable for the direct and quantitative measurement of ROS. In particular, the spectroscopic technique (EPRS) is used in many fields of application, including biomedicine [82]. The reliability and reproducibility of EPR data obtained using the micro-invasive EPR method adopted in this study have already been reported previously [83].

Briefly, for ROS detection,  $50\text{ }\mu\text{L}$  of plasma was treated with an equal volume of CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine), and then  $50\text{ }\mu\text{L}$  of this solution was placed inside a glass EPR capillary tube in the spectrometer cavity for data acquisition. A stable radical CP (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) was used as an external reference to convert the obtained ROS values into absolute quantitative values ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). All EPR spectra were generated by adopting the same protocol and obtained by using a standard software program supplied by Bruker (Billerica, MA, USA) (version 2.11, WinEPR System).

### 5.2.2. Total Antioxidant Capacity (TAC)

The 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)-equivalent antioxidant capacity assay, a widely used kit-based commercial method, was used. Briefly,  $10\text{ }\mu\text{L}$  of plasma was added in duplicate to  $10\text{ }\mu\text{L}$  of metmyoglobin and  $150\text{ }\mu\text{L}$  of the chromogen solution; then, reactions were initiated through the addition of  $40\text{ }\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as indicated by the instructions (No. 709001, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Reaction mixtures were incubated at room temperature for 3 min and then read by measuring the absorbance signal at  $750\text{ nm}$  using an Infinite M200 microplate reader spectrophotometer (Tecan, Grödig, Austria). A linear calibration curve was computed from pure Trolox-containing reactions.

## 5.3. Urine Sample Analysis

### 5.3.1. Nitric Oxide Metabolites ( $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ )

$\text{NO}_x$  ( $\text{NO}_2+\text{NO}_3$ ) concentrations were determined in urine via a colorimetric method based on the Griess reaction, using a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), as previously described [84]. Samples were spectrophotometrically read at  $545\text{ nm}$ .

### 5.3.2. 8-Isoprostane (8-iso-PGF $2\alpha$ )

Levels of 8-iso-PGF $2\alpha$  were measured using an immunoassay EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) in urine. This is a biomarker for lipid peroxidation and damage assessment. Samples and standards were spectrophotometrically read at  $412\text{ nm}$ . Results were normalized using urine creatinine values.

### 5.3.3. Interleukin-6

IL-6 levels were determined using an ELISA assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), based on the double-antibody “sandwich” technique in accordance with the manufacturer’s instructions.

All the above samples and standards were read using a microplate reader spectrophotometer (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The obtained values

were assessed in duplicate, and the inter-assay coefficient of variation was in the range indicated by the manufacturer.

#### 5.3.4. Creatinine, Neopterin, and Uric Acid Concentrations

Urinary creatinine, neopterin, interleukin 6 (IL-6), and uric acid concentrations were measured via high-pressure liquid chromatography (HPLC), as previously described [18], using a Varian instrument (pump 240, autosampler ProStar 410, SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canada) coupled to a UV-VIS detector (Shimadzu SPD 10-AV,  $\lambda = 240$  nm, SpectraLab Scientific Inc., for creatinine and uric acid; and JASCO FP-1520,  $\lambda_{ex} = 355$  nm and at  $\lambda_{em} = 450$  nm, SpectraLab Scientific Inc., for neopterin).

After the urine centrifugation of  $1500 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 5 min, analytic separation procedures were performed at  $50^\circ\text{C}$  on a  $5\ \mu\text{m}$  Discovery C18 analytical column ( $250 \times 4.6$  mm I.D., Supelco, Sigma-Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milano, Italy) at a flow rate of 0.9 mL/min. The calibration curves were linear over the range of 0.125–1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.625–20 mmol/L, and 1.25–10 mmol/L for neopterin, uric acid, and creatinine levels, respectively. The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were <5%.

#### 5.4. Visual Analog Scale (VAS)

Subjective mood, general wellness/malaise, restfulness/tiredness, headaches, sleepiness, and nausea were evaluated using a 0–100 mm visual analog scale (VAS). This scoring system was previously suggested for assessing discomfort and/or general malaise [85]. Based on its usefulness in performing other clinical evaluations, VAS was considered suitable to test the subjective perception of normobaric hypoxia effects [37,86].

#### 5.5. Statistical Analysis

The normality of the results was verified using the Shapiro–Wilk test. Comparisons between results at different times and the baseline were carried out using repeated-measure one-way ANOVA tests when the results had a Gaussian distribution. Otherwise, a Friedman test was applied. Comparisons between the 10% and 15% exposure groups were performed using an unpaired *t*-test (parametric) or Mann–Whitney (nonparametric) test. All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All statistical tests were performed using a standard computer statistical package, GraphPad Prism version 9.5.1., for PC (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A threshold of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The sample size required for a repeated-measure analysis of variance (Friedman) was calculated using G\*power calculator 3.1.9.7 software (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany) (effect size = 0.65, alpha error = 0.05, power = 0.80), and the requisite number of participants for this study was six in each group, which parallels previous studies [87].

## 6. Conclusions

A short duration (60 min) of extreme and moderate hypoxia led to a significant increase in the production of reactive oxygen species (ROS), peaking 30 min after exposure and slowly recovering after 48 h.

Renal function was astonishingly quickly activated to counteract such hypoxic stimuli, using the antioxidant action of uric acid and creatinine to counteract ROS and NO<sub>x</sub>, together with TAC significant variations.

We also found an increase in lipid peroxidation caused by ROS, starting at 2 h post-exposure.

Finally, we observed an immune system stimulation through increasing concentrations of neopterin. The rapid increase in neopterin following the ROS peak suggests a counteraction to the inflammasome complex, favoring the NRF2 pathway. Interestingly, neopterin modulation is inversely proportional to the importance of hypoxia. These small variations are very interesting as preconditioning tools.

Overall, this study provides insights into the mechanisms through which acute hypoxia affects various bodily functions and how the body responds to hypoxia-induced oxidative stress. It also highlights the protective mechanisms that humans have in place to maintain redox homeostasis in response to environmental stressors.

**Author Contributions:** All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication. Conceptualization, C.B., P.L., P.G., C.L., S.T., K.L., M.L., S.M.S., A.V., M.G. and F.G.; investigation, P.L., C.L., M.L., S.T., C.B., K.L., P.G., S.M.S., A.V. and M.G.; writing, C.L., S.T., C.B., P.G., P.L., S.M.S. and F.G.; funding, C.B., K.L. and S.T.; data analysis, C.L., S.M.S., A.V., M.G., C.B., S.T., K.L., M.L., P.L., F.G. and P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This manuscript is part of the DELTO<sub>2</sub>X Project is funded by WBE (Wallonia-Brussels Education), Belgium, to the Environmental, Occupational, and Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), Belgium. The sponsors had no role in the design and conduct of the study; collection, management, analysis, and interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or the decision to submit the manuscript for publication.

**Institutional Review Board Statement:** Ethics Committee approval was obtained from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (No. B 200-2020-088).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are available at request from the authors.

**Acknowledgments:** Authors are grateful to all volunteer participants, especially students of the Haute Ecole Bruxelles-Brabant (Belgium), Motor Sciences Department (Physiotherapy).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

8-iso-PGF <sub>2</sub> α	8-Isoprostane
AH	Acute hypoxia
EPR	Electron paramagnetic resonance
FiO <sub>2</sub>	Inspired fraction of oxygen
HO•	Hydroxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
IL-6	Interleukin-6
NOx	Nitric oxide metabolites
NRF2	Nuclear factor erythroid-2-related Factor 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ONOO-	Superoxide anion Peroxynitrite
ROS	Reactive oxygen species
TAC	Total antioxidant capacity
UA	Uric acid
VAS	Visual analog scale

### References

1. Cable, G.G. In-flight hypoxia incidents in military aircraft: Causes and implications for training. *Aviat. Space Environ. Med.* **2003**, *74*, 169–172. [[PubMed](#)]
2. Serebrovskaya, T.V.; Manukhina, E.B.; Smith, M.L.; Downey, H.F.; Mallet, R.T. Intermittent hypoxia: Cause of or therapy for systemic hypertension? *Exp. Biol. Med.* **2008**, *233*, 627–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Serebrovskaya, T.V.; Nikolsky, I.S.; Nikolska, V.V.; Mallet, R.T.; Ishchuk, V.A. Intermittent hypoxia mobilizes hematopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High Alt. Med. Biol.* **2011**, *12*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Urdampilleta, A.; González-Muniesa, P.; Portillo, M.P.; Martínez, J.A. Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity. *J. Physiol. Biochem.* **2012**, *68*, 289–304. [[CrossRef](#)]
5. Guner, I.; Uzun, D.D.; Yaman, M.O.; Genc, H.; Gelisgen, R.; Korkmaz, G.G.; Hallac, M.; Yelmen, N.; Sahin, G.; Karter, Y.; et al. The effect of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on bone mineral density in rats: Role of nitric oxide. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, *154*, 262–267. [[CrossRef](#)]

6. Lu, X.J.; Chen, X.Q.; Weng, J.; Zhang, H.Y.; Pak, D.T.; Luo, J.H.; Du, J.Z. Hippocampal spine-associated Rap-specific GTPase-activating protein induces enhancement of learning and memory in postnatally hypoxia-exposed mice. *Neuroscience* **2009**, *162*, 404–414. [\[CrossRef\]](#)
7. Zhang, J.X.; Chen, X.Q.; Du, J.Z.; Chen, Q.M.; Zhu, C.Y. Neonatal exposure to intermittent hypoxia enhances mice performance in water maze and 8-arm radial maze tasks. *J. Neurobiol.* **2005**, *65*, 72–84. [\[CrossRef\]](#)
8. Tsai, Y.W.; Yang, Y.R.; Sun, S.H.; Liang, K.C.; Wang, R.Y. Post ischemia intermittent hypoxia induces hippocampal neurogenesis and synaptic alterations and alleviates long-term memory impairment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2013**, *33*, 764–773. [\[CrossRef\]](#)
9. Tsai, Y.W.; Yang, Y.R.; Wang, P.S.; Wang, R.Y. Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos expression and reverses spatial memory deficits in rats. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24001. [\[CrossRef\]](#)
10. Haider, T.; Casucci, G.; Linser, T.; Faulhaber, M.; Gatterer, H.; Ott, G.; Linser, A.; Ehrenbourg, I.; Tkatchouk, E.; Burtscher, M.; et al. Interval hypoxic training improves autonomic cardiovascular and respiratory control in patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *J. Hypertens.* **2009**, *27*, 1648–1654. [\[CrossRef\]](#)
11. Wang, Z.-H.; Chen, Y.-X.; Zhang, C.-M.; Wu, L.; Yu, Z.; Cai, X.-L.; Guan, Y.; Zhou, Z.-N.; Yang, H.-T. Intermittent hypobaric hypoxia improves postischemic recovery of myocardial contractile function via redox signaling during early reperfusion. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2011**, *301*, H1695–H1705. [\[CrossRef\]](#)
12. Querido, J.S.; Sheel, A.W.; Cheema, R.; Van Eeden, S.; Mulgrew, A.T.; Ayas, N.T. Effects of 10 days of modest intermittent hypoxia on circulating measures of inflammation in healthy humans. *Sleep Breath.* **2012**, *16*, 657–662. [\[CrossRef\]](#)
13. De Bels, D.; Corazza, F.; Germonpre, P.; Balestra, C. The normobaric oxygen paradox: A novel way to administer oxygen as an adjuvant treatment for cancer? *Med. Hypotheses* **2010**, *76*, 467–470. [\[CrossRef\]](#)
14. Balestra, C.; Lambrechts, K.; Mrakic-Spota, S.; Vezzoli, A.; Levenez, M.; Germonpre, P.; Virgili, F.; Bosco, G.; Lafere, P. Hypoxic and Hyperoxic Breathing as a Complement to Low-Intensity Physical Exercise Programs: A Proof-of-Principle Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9600. [\[CrossRef\]](#)
15. Clarke, C. Acute mountain sickness: Medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia. *Postgrad. Med. J.* **2006**, *82*, 748–753. [\[CrossRef\]](#)
16. Puri, S.; Panza, G.; Mateika, J.H. A comprehensive review of respiratory, autonomic and cardiovascular responses to intermittent hypoxia in humans. *Exp. Neurol.* **2021**, *341*, 113709. [\[CrossRef\]](#)
17. De Bels, D.; Theunissen, S.; Devriendt, J.; Germonpre, P.; Lafere, P.; Valsamis, J.; Snoeck, T.; Meeus, P.; Balestra, C. The 'normobaric oxygen paradox': Does it increase haemoglobin? *Diving Hyperb. Med.* **2012**, *42*, 67–71.
18. Bosco, G.; Paganini, M.; Giacon, T.A.; Oppio, A.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Moro, T.; Paoli, A.; Zanotti, F.; Zavan, B.; et al. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9755. [\[CrossRef\]](#)
19. Hamlin, M.J.; Marshall, H.C.; Hellemans, J.; Ainslie, P.N. Effect of intermittent hypoxia on muscle and cerebral oxygenation during a 20-km time trial in elite athletes: A preliminary report. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2010**, *35*, 548–559. [\[CrossRef\]](#)
20. Ventura, N.; Hoppeler, H.; Seiler, R.; Binggeli, A.; Mullis, P.; Vogt, M. The response of trained athletes to six weeks of endurance training in hypoxia or normoxia. *Int. J. Sports Med.* **2003**, *24*, 166–172. [\[CrossRef\]](#)
21. Morton, J.P.; Cable, N.T. Effects of intermittent hypoxic training on aerobic and anaerobic performance. *Ergonomics* **2005**, *48*, 1535–1546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Truijens, M.J.; Toussaint, H.M.; Dow, J.; Levine, B.D. Effect of high-intensity hypoxic training on sea-level swimming performances. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *94*, 733–743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. De Smet, S.; Van Thienen, R.; Deldicque, L.; James, R.; Sale, C.; Bishop, D.J.; Hespel, P. Nitrate Intake Promotes Shift in Muscle Fiber Type Composition during Sprint Interval Training in Hypoxia. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 233. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Hoppeler, H.; Kleinert, E.; Schlegel, C.; Claassen, H.; Howald, H.; Kayar, S.R.; Cerretelli, P. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *Int. J. Sports Med.* **1990**, *11* (Suppl. S1), S3–S9. [\[CrossRef\]](#)
25. Millet, G.P.; Girard, O. Editorial: High-Intensity Exercise in Hypoxia: Beneficial Aspects and Potential Drawbacks. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 1017. [\[CrossRef\]](#)
26. Lundby, C.; Millet, G.P.; Calbet, J.A.; Bärtsh, P.; Subudhi, A.W. Does 'altitude training' increase exercise performance in elite athletes? *Br. J. Sports Med.* **2012**, *46*, 792–795. [\[CrossRef\]](#)
27. Luo, Z.; Tian, M.; Yang, G.; Tan, Q.; Chen, Y.; Li, G.; Zhang, Q.; Li, Y.; Wan, P.; Wu, J. Hypoxia signaling in human health and diseases: Implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 218. [\[CrossRef\]](#)
28. Burtscher, M.; Pachinger, O.; Ehrenbourg, I.; Mitterbauer, G.; Faulhaber, M.; Pühringer, R.; Tkatchouk, E. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* **2004**, *96*, 247–254. [\[CrossRef\]](#)
29. Bayer, U.; Likar, R.; Pinter, G.; Stettner, H.; Demtschar, S.; Trummer, B.; Neuwersch, S.; Glazachev, O.; Burtscher, M. Intermittent hypoxic-hyperoxic training on cognitive performance in geriatric patients. *Alzheimers Dement.* **2017**, *3*, 114–122. [\[CrossRef\]](#)
30. Dudnik, E.; Zagaynaya, E.; Glazachev, O.S.; Susta, D. Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Conditioning Improves Cardiorespiratory Fitness in Older Comorbid Cardiac Outpatients Without Hematological Changes: A Randomized Controlled Trial. *High Alt. Med. Biol.* **2018**, *19*, 339–343. [\[CrossRef\]](#)
31. Camacho-Cardenosa, A.; Burtscher, J.; Burtscher, M.; Camacho-Cardenosa, M. Editorial: Hypoxia as a therapeutic tool in search of healthy aging. *Front. Physiol.* **2023**, *13*, 1112129. [\[CrossRef\]](#)



32. Mrakic-Spota, S.; Gussoni, M.; Dellanoce, C.; Marzorati, M.; Montorsi, M.; Rasica, L.; Pratali, L.; D'Angelo, G.; Martinelli, M.; Bastiani, L.; et al. Effects of acute and sub-acute hypobaric hypoxia on oxidative stress: A field study in the Alps. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2021**, *121*, 297–306. [[CrossRef](#)]
33. De Bels, D.; Tillmans, F.; Corazza, F.; Bizzari, M.; Germonpre, P.; Radermacher, P.; Orman, K.G.; Balestra, C. Hyperoxia Alters Ultrastructure and Induces Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Biomolecules* **2020**, *10*, 282. [[CrossRef](#)]
34. Balestra, C.; Arya, A.K.; Leveque, C.; Virgili, F.; Germonpre, P.; Lambrechts, K.; Lafere, P.; Thom, S.R. Varying Oxygen Partial Pressure Elicits Blood-Borne Microparticles Expressing Different Cell-Specific Proteins-Toward a Targeted Use of Oxygen? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7888. [[CrossRef](#)]
35. Mrakic-Spota, S.; Gussoni, M.; Marzorati, M.; Porcelli, S.; Bosco, G.; Balestra, C.; Montorsi, M.; Lafortuna, C.; Vezzoli, A. The "ON-OFF" Switching Response of Reactive Oxygen Species in Acute Normobaric Hypoxia: Preliminary Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4012. [[CrossRef](#)]
36. Magalhães, J.; Ascensão, A.; Viscor, G.; Soares, J.; Oliveira, J.; Marques, F.; Duarte, J. Oxidative stress in humans during and after 4 h of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m. *Aviat. Space Environ. Med.* **2004**, *75*, 16–22. [[PubMed](#)]
37. Bailey, D.M.; Ainslie, P.N.; Jackson, S.K.; Richardson, R.S.; Ghatei, M. Evidence against redox regulation of energy homeostasis in humans at high altitude. *Clin. Sci.* **2004**, *107*, 589–600. [[CrossRef](#)]
38. Coppel, J.; Hennis, P.; Gilbert-Kawai, E.; Grocott, M.P. The physiological effects of hypobaric hypoxia versus normobaric hypoxia: A systematic review of crossover trials. *Extrem. Physiol. Med.* **2015**, *4*, 2. [[CrossRef](#)]
39. Khan, S.A.; Nanduri, J.; Yuan, G.; Kinsman, B.; Kumar, G.K.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; Prabhakar, N.R. NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial complex I inhibition: Relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 533–542. [[CrossRef](#)]
40. Fridovich, I. Superoxide Radical And Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 97–112. [[CrossRef](#)]
41. Jiménez-Banzo, A.; Sagristà, M.L.; Mora, M.; Nonell, S. Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free. Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 1926–1934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Redmond, R.W.; Kochevar, I.E. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1178–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kim, H.; Scimia, M.C.; Wilkinson, D.; Trelles, R.D.; Wood, M.R.; Bowtell, D.; Dillin, A.; Mercola, M.; Ronai, Z.A. Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 532–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Liu, X.; Hajnóczky, G. Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1561–1572. [[CrossRef](#)]
45. Fuhrmann, D.C.; Brüne, B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 208–215. [[CrossRef](#)]
46. Huie, R.E.; Padmaja, S. The Reaction of  $\text{NO}$  With Superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **1993**, *18*, 195–199. [[CrossRef](#)]
47. Ribon, A.; Pialoux, V.; Saugy, J.J.; Rupp, T.; Faiss, R.; Debevec, T.; Millet, G.P. Exposure to hypobaric hypoxia results in higher oxidative stress compared to normobaric hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2016**, *223*, 23–27. [[CrossRef](#)]
48. Radi, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5839–5848. [[CrossRef](#)]
49. Schildknecht, S.; Ullrich, V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *484*, 183–189. [[CrossRef](#)]
50. Fujii, J.; Homma, T.; Osaki, T. Superoxide Radicals in the Execution of Cell Death. *Antioxidants* **2022**, *11*, 501. [[CrossRef](#)]
51. Vermot, A.; Petit-Härtlein, I.; Smith, S.M.E.; Fieschi, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants* **2021**, *10*, 890. [[CrossRef](#)]
52. Ames, B.N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6858–6862. [[CrossRef](#)]
53. Maxwell, S.R.; Thomason, H.; Sandler, D.; Leguen, C.; Baxter, M.A.; Thorpe, G.H.; Jones, A.F.; Barnett, A.H. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Investig.* **1997**, *27*, 484–490. [[CrossRef](#)]
54. Waring, W.S.; Webb, D.J.; Maxwell, S.R. Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, *38*, 365–371. [[CrossRef](#)]
55. Waring, W.S.; Convery, A.; Mishra, V.; Shenkin, A.; Webb, D.J.; Maxwell, S.R.J. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin. Sci.* **2003**, *105*, 425–430. [[CrossRef](#)]
56. Kang, D.-H.; Ha, S.-K. Uric Acid Puzzle: Dual Role as Anti-oxidant and Pro-oxidant. *Electrolyte Blood Press.* **2014**, *12*, 1–6. [[CrossRef](#)]
57. Arazi, H.; Eghbali, E.; Suzuki, K. Creatine Supplementation, Physical Exercise and Oxidative Stress Markers: A Review of the Mechanisms and Effectiveness. *Nutrients* **2021**, *13*, 869. [[CrossRef](#)]
58. Luks, A.M.; Johnson, R.J.; Swenson, E.R. Chronic kidney disease at high altitude. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2008**, *19*, 2262–2271. [[CrossRef](#)]
59. Matthews, R.T.; Yang, L.; Jenkins, B.G.; Ferrante, R.J.; Rosen, B.R.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M.F. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 156–163. [[CrossRef](#)]

60. Lawler, J.M.; Barnes, W.S.; Wu, G.; Song, W.; Demaree, S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 47–52. [[CrossRef](#)]
61. Sestili, P.; Martinelli, C.; Bravi, G.; Piccoli, G.; Curci, R.; Battistelli, M.; Falcieri, E.; Agostini, D.; Gioacchini, A.M.; Stocchi, V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 837–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Beckman, K.B.; Ames, B.N. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19633–19636. [[CrossRef](#)]
63. Kasai, H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* **1997**, *387*, 147–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pedersen, E.R.; Middtun, Ø.; Ueland, P.M.; Schartum-Hansen, H.; Seifert, R.; Igland, J.; Nordrehaug, J.E.; Ebbing, M.; Svingen, G.; Bleie, Ø.; et al. Systemic markers of interferon- $\gamma$ -mediated immune activation and long-term prognosis in patients with stable coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 698–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Melichar, B.; Spisarová, M.; Bartoušková, M.; Krčmová, L.K.; Javorská, L.; Študentová, H. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*, 280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Baydar, T.; Yuksel, O.; Sahin, T.T.; Dikmen, K.; Girgin, G.; Sipahi, H.; Kurukahvecioglu, O.; Bostanci, H.; Sare, M. Neopterin as a prognostic biomarker in intensive care unit patients. *J. Crit. Care* **2009**, *24*, 318–321. [[CrossRef](#)]
67. Eisenhut, M. Neopterin in Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. *J. Biomark.* **2013**, *2013*, 196432. [[CrossRef](#)]
68. Signorelli, S.S.; Anzaldi, M.; Fiore, V.; Candido, S.; Di Marco, R.; Mangano, K.; Quattrocchi, C.; Neri, S. Neopterin: A potential marker in chronic peripheral arterial disease. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 1855–1858. [[CrossRef](#)]
69. Fratantonio, D.; Virgili, F.; Zucchi, A.; Lambrechts, K.; Latronico, T.; Lafere, P.; Germonpre, P.; Balestra, C. Increasing Oxygen Partial Pressures Induce a Distinct Transcriptional Response in Human PBMC: A Pilot Study on the “Normobaric Oxygen Paradox”. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 458. [[CrossRef](#)]
70. De Paula Martins, R.; Ghisoni, K.; Lim, C.K.; Aguiar, A.S.; Guillemin, G.J.; Latini, A. Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *115*, 371–382. [[CrossRef](#)]
71. Mrakic-Sposta, S.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Marzorati, M.; Healey, B.; Dellanoce, C.; Vezzoli, A. Effects of Prolonged Exposure to Hypobaric Hypoxia on Oxidative Stress: Overwintering in Antarctic Concordia Station. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 4430032. [[CrossRef](#)]
72. Schaefer, E.; Wu, W.; Mark, C.; Yang, A.; Digiaco, E.; Carlton-Smith, C.; Salloum, S.; Brisac, C.; Lin, W.; Corey, K.E.; et al. Intermittent hypoxia is a proinflammatory stimulus resulting in IL-6 expression and M1 macrophage polarization. *Hepatol. Commun.* **2017**, *1*, 326–337. [[CrossRef](#)]
73. Peng, Y.; Yang, Q.; Gao, S.; Liu, Z.; Kong, W.; Bian, X.; Li, Z.; Ye, J. IL-6 protects cardiomyocytes from oxidative stress at the early stage of LPS-induced sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *603*, 144–152. [[CrossRef](#)]
74. Wang, L.; Yang, S.; Yan, L.; Wei, H.; Wang, J.; Yu, S.; Kong, A.T.; Zhang, Y. Hypoxia preconditioning promotes endurance exercise capacity of mice by activating skeletal muscle Nrf2. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *127*, 1267–1277. [[CrossRef](#)]
75. World Medical, A. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [[CrossRef](#)]
76. Cimino, F.; Balestra, C.; Germonpre, P.; De Bels, D.; Tillmans, F.; Saija, A.; Speciale, A.; Virgili, F. Pulsed high oxygen induces a hypoxic-like response in human umbilical endothelial cells and in humans. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *113*, 1684–1689. [[CrossRef](#)]
77. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; D'Alessandro, F.; Paganini, M.; Dellanoce, C.; Cialoni, D.; Bosco, G. Change in Oxidative Stress Biomarkers During 30 Days in Saturation Dive: A Pilot Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 7118. [[CrossRef](#)]
78. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; et al. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2018**, *9*, 157. [[CrossRef](#)]
79. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Rizzato, A.; Della Noce, C.; Malacrida, S.; Montorsi, M.; Paganini, M.; Cancellara, P.; Bosco, G. Oxidative stress assessment in breath-hold diving. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 2449–2456. [[CrossRef](#)]
80. Bosco, G.; Rizzato, A.; Quartesan, S.; Camporesi, E.; Mrakic-Sposta, S.; Moretti, S.; Balestra, C.; Rubini, A. Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water. *Undersea Hyperb. Med.* **2018**, *45*, 191–198. [[CrossRef](#)]
81. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A. A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 306179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Menzel, A.; Samouda, H.; Dohet, F.; Loap, S.; Ellulu, M.S.; Bohn, T. Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice—Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants* **2021**, *10*, 836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A. Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 973927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ciccone, M.M.; Bilianou, E.; Balbarini, A.; Gesualdo, M.; Ghiadoni, L.; Metra, M.; Palmiero, P.; Pedrinelli, R.; Salvetti, M.; Scicchitano, P.; et al. Task force on: ‘Early markers of atherosclerosis: Influence of age and sex’. *J. Cardiovasc. Med.* **2013**, *14*, 757–766. [[CrossRef](#)]
85. Wu, J.; Chen, Y.; Luo, Y. Evaluation of the visual analog score (VAS) to assess acute mountain sickness (AMS) in a hypobaric chamber. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113376. [[CrossRef](#)]

86. Bailey, D.M.; Bain, A.R.; Hoiland, R.L.; Barak, O.F.; Drvis, I.; Hirtz, C.; Lehmann, S.; Marchi, N.; Janigro, D.; MacLeod, D.B.; et al. Hypoxemia increases blood-brain barrier permeability during extreme apnea in humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2022**, *42*, 1120–1135. [[CrossRef](#)]
87. Leveque, C.; Mrakic-Sposta, S.; Lafère, P.; Vezzoli, A.; Germonpré, P.; Beer, A.; Mievis, S.; Virgili, F.; Lambrechts, K.; Theunissen, S.; et al. Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24*, 664. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Cinétique de la réponse au stress oxydant après 60 minutes d'exposition à des hyperoxies normobares différentes (30% ou 100%).

### Résumé :

L'oxygène, essentiel au développement des organismes aérobies, est également utilisé en thérapie médicale. Son utilisation s'étend au-delà de la correction de l'hypoxie, explorant des applications dans le vieillissement, la dégénérescence du cartilage, la prédiabète et la neuroprotection. Les fractions d'oxygène inhalées (FiO<sub>2</sub>), qu'elles soient hypoxiques ou hyperoxiques, sont couramment utilisées dans divers contextes, tels que la préconditionnement cardiovasculaire, l'entraînement sportif et les environnements extrêmes. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) agissent comme des signaux dans l'homéostasie cellulaire, mais leur augmentation peut causer un stress oxydatif, endommageant les composants cellulaires. Le stress oxydatif est lié à l'inflammation, au système immunitaire et au métabolisme. Malgré l'identification de mécanismes, la cinétique de la réponse cellulaire à différentes pressions partielles d'oxygène reste peu étudiée. Cette étude vise à décrire cette cinétique après une seule exposition à des FiO<sub>2</sub> variées (30% et 100%) dans des conditions normobares.

Nous avons examiné les réponses métaboliques à l'inhalation d'oxygène normobare pendant 1 heure, avec des fractions inspirées légères (30%) et élevées (100%). Quatorze sujets en bonne santé, non-fumeurs (7 hommes et 7 femmes ; âge : 29,9 ± 11,1 ans, taille : 168,2 ± 9,37 cm ; poids : 64,4 ± 12,3 kg ; IMC : 22,7 ± 4,1), ont été assignés de manière aléatoire aux deux groupes. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant l'inhalation, à 30 minutes, 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures après l'exposition unique à l'oxygène. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant l'inhalation, à 30 minutes, 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures après l'exposition unique à l'oxygène. Le niveau d'oxydation a été évalué par le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les niveaux d'isoprostanes. Les réactions antioxydantes ont été observées par la capacité antioxydante totale (TAC), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT). La réponse inflammatoire a été mesurée en utilisant l'interleukine-6 (IL-6), la néoptérine, la créatinine et les urates.

Les résultats indiquent que l'inhalation d'oxygène induit un stimulus hormétique avec une augmentation de la production de ROS dès 30 minutes après l'exposition. Les réponses varient entre les groupes 100% et 30%, avec des différences statistiques à 48 heures. Les niveaux d'isoprostanes montrent une peroxydation significative des lipides. L'absence de réponse antioxydante intracellulaire suggère un état de "permissive oxidation". Les données soulignent une modulation de la réponse cellulaire à l'oxygène ciblé, confirmée par l'expression de microparticules. Des réponses inflammatoires et des changements métaboliques différenciés entre 30% et 100% d'oxygène sont observés, suggérant une possible modulation immunitaire. Cette étude met en évidence le concept d'hormèse chez les mammifères, soulignant la capacité d'adaptation aux stress par des réponses dynamiques de réparation, de récupération et de toxicité au fil du temps. Les résultats mettent en lumière l'importance de comprendre la cinétique des mécanismes cellulaires en réponse à des expositions variables d'oxygène.

Article

# Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures

Clément Leveque <sup>1,2</sup>, Simona Mrakic-Spota <sup>3</sup>, Pierre Lafère <sup>1,2,4</sup>, Alessandra Vezzoli <sup>3</sup>, Peter Germonpré <sup>1,4,5</sup>, Alexandre Beer <sup>1</sup>, Stéphane Mievis <sup>1</sup>, Fabio Virgili <sup>6</sup>, Kate Lambrechts <sup>1</sup>, Sigrid Theunissen <sup>1</sup>, François Guerrero <sup>2</sup> and Costantino Balestra <sup>1,4,7,8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Environmental, Occupational, Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), 1160 Brussels, Belgium
  - <sup>2</sup> Laboratoire ORPHY, EA 4324, Université de Bretagne Occidentale, 29238 Brest, France
  - <sup>3</sup> Institute of Clinical Physiology, National Research Council (CNR), 20162 Milan, Italy
  - <sup>4</sup> DAN Europe Research Division (Roseto-Brussels), 1020 Brussels, Belgium
  - <sup>5</sup> Hyperbaric Centre, Queen Astrid Military Hospital, 1120 Brussels, Belgium
  - <sup>6</sup> Council for Agricultural Research and Economics-Food and Nutrition Research Centre (C.R.E.A.-AN), 00187 Rome, Italy
  - <sup>7</sup> Anatomical Research and Clinical Studies, Vrije Universiteit Brussels (VUB), 1090 Brussels, Belgium
  - <sup>8</sup> Motor Sciences Department, Physical Activity Teaching Unit, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium
- \* Correspondence: costantinobalestra@gmail.com



**Citation:** Leveque, C.; Mrakic-Spota, S.; Lafère, P.; Vezzoli, A.; Germonpré, P.; Beer, A.; Mievis, S.; Virgili, F.; Lambrechts, K.; Theunissen, S.; et al. Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 664. <https://doi.org/10.3390/ijms24010664>

Academic Editor: Guido R.M.M. Haenen

Received: 17 November 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 26 December 2022

Published: 30 December 2022



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Oxygen is a powerful trigger for cellular reactions and is used in many pathologies, including oxidative stress. However, the effects of oxygen over time and at different partial pressures remain poorly understood. In this study, the metabolic responses of normobaric oxygen intake for 1 h to mild (30%) and high (100%) inspired fractions were investigated. Fourteen healthy non-smoking subjects (7 males and 7 females; age:  $29.9 \pm 11.1$  years, height:  $168.2 \pm 9.37$  cm; weight:  $64.4 \pm 12.3$  kg; BMI:  $22.7 \pm 4.1$ ) were randomly assigned in the two groups. Blood samples were taken before the intake at 30 min, 2 h, 8 h, 24 h, and 48 h after the single oxygen exposure. The level of oxidation was evaluated by the rate of reactive oxygen species (ROS) and the levels of isoprostane. Antioxidant reactions were observed by total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). The inflammatory response was measured using interleukin-6 (IL-6), neopterin, creatinine, and urates. Oxidation markers increased from 30 min on to reach a peak at 8 h. From 8 h post intake, the markers of inflammation took over, and more significantly with 100% than with 30%. This study suggests a biphasic response over time characterized by an initial “permissive oxidation” followed by increased inflammation. The antioxidant protection system seems not to be the leading actor in the first place. The kinetics of enzymatic reactions need to be better studied to establish therapeutic, training, or rehabilitation protocols aiming at a more targeted use of oxygen.

**Keywords:** normobaric oxygen paradox; hyperoxic-hypoxic paradox; hyperoxia; oxygen biology; cellular reactions; human; oxygen therapy; human performance; decompression; diving

## 1. Introduction

Oxygen, the third most abundant element in the biosphere, is mostly known for its role in the development and ability to sustain aerobic organisms [1], and it is administered as a therapeutic agent [2]. Indeed, oxygen is considered as a cornerstone of modern medical care within well-defined limits to mitigate adverse effects [3]. Nowadays, oxygen use is not only limited to counteract hypoxia or restore patient saturation. New research paths have coined the use of several inhaled oxygen fractions ( $\text{FiO}_2$ ) in the physiology of aging [4,5], such as cartilage degeneration [6], prediabetes [7], or neuroprotection [8]. It must be acknowledged that variable  $\text{FiO}_2$ , hypoxic or hyperoxic, is already relatively common, for instance, for

preconditioning in cardiovascular disease [9,10], sports training [11], and before exposure to challenging environments such as scuba diving [12], high altitude military parachute freefall [13,14], and space flight activities [15].

Under physiological conditions, unstable molecules derived from oxygen called reactive oxygen species (ROS; i.e., superoxide anions ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxyl radicals ( $\bullet OH$ ), peroxy radicals ( $ROO\bullet$ ), and alkoxy radicals ( $RO\bullet$ )), are primary signals to modulate several pathways involved in homeostasis and cell proliferation/differentiation/survival [16,17].

ROS increase due to environmental and/or chemical stimuli. When ROS increase and the endogenous antioxidant system (enzymatic and/or non-enzymatic) is perturbed, oxidative stress is triggered. This results in damage to lipids, proteins, and DNA [18–20].

Furthermore, it is known that oxidative stress, inflammation, the immune system, and metabolism are intricately intertwined [21,22]. Specific inflammatory cytokines utilize ROS as part of their signaling cascades, and these can contribute to the development and/or progression of acute or chronic inflammatory responses [23].

Our previous works highlighted the non-linearity of the dose–response curve, which makes the definition of an optimal oxygen dose difficult.

Based on the current literature, several factors such as  $FiO_2$  [11,15,24,25], duration and frequency [26–28], or pressure of exposure—either normobaric, hypobaric, or hyperbaric [15,26,29]—may influence the ability to reach a specific clinical or molecular effect.

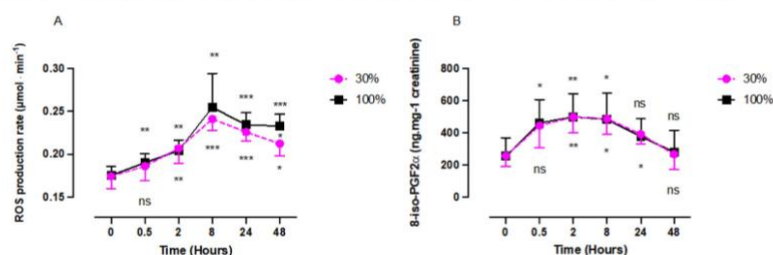
Although some mechanisms were identified, there is a lack of data regarding the kinetics of the cellular response to those different oxygen partial pressures.

Therefore, the objective of this study is to describe the kinetics of cell expression in response to a single exposure at different  $FiO_2$  percentages (30% and 100%) in normobaric conditions only.

## 2. Results

### 2.1. Reactive Oxygen Species (ROS) Rate and Isoprostane Levels after One Hour of Oxygen Exposure at a $FiO_2$ of 30% or 100%

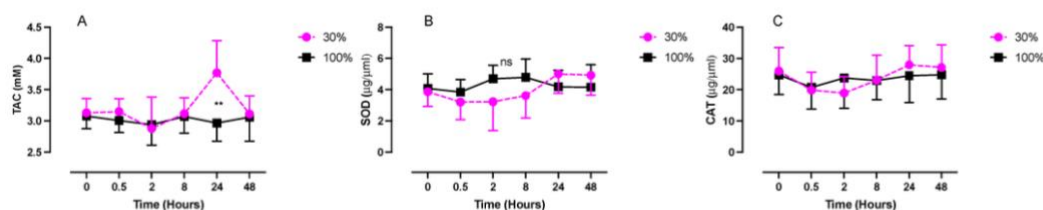
Both oxygen exposures, 30% and 100%, elicited a significant increase of plasmatic ROS production rate (Figure 1A). Both responses were similar in amplitude and shape, characterized by a significant increase with a peak at 8 h after exposure (30%:  $0.24 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 100%:  $0.25 \pm 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) followed by a decrease after 30%, reaching a plateau after 100%. At 48 h, there was a significant difference between oxygen concentrations (30%:  $0.21 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 100%:  $0.23 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $p = 0.012$ , unpaired  $t$  test). Isoprostane (8-iso-PGF $_{2\alpha}$ ), a biomarker of lipid peroxidation (Figure 1B), followed the same trend for both oxygen exposures with a peak at 2 h after 30% exposure ( $498.7 \pm 99.55 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; 100%:  $499.1 \pm 164.0 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ;  $p = 0.0078$ ). At 48 h the baseline was reached for both exposures (30%:  $266.4 \pm 95.67 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ; 100%:  $281.2 \pm 135.3 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ ;  $p = 0.63$  and  $0.99$ , respectively).



**Figure 1.** Evolution of ROS (A) production rate and isoprostane level (B) after 60 min of mild (30%,  $n = 6$ ) or high (100%,  $n = 8$ ) hyperoxia. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents pre-exposure baseline (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ; intragroup: one-way ANOVA; intergroup: unpaired  $t$  test).

## 2.2. Antioxidant Response (TAC, SOD, CAT) after One Hour of Oxygen Exposure at a $\text{FiO}_2$ of 30% or 100%

Figure 2 illustrates the antioxidant response as a function of blood total antioxidant capacity (TAC), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) concentration. SOD and CAT activities were not modified by oxygen exposure (30%:  $3.9 \pm 0.9$  U/mL and  $25.9 \pm 7.5$  U/mL, respectively; 100%:  $4.1 \pm 0.9$  U/mL and  $24.7 \pm 6.3$  U/mL, respectively). Nonetheless, compared to 100%, after being exposed at 30%, the TAC was significantly increased 24 h after the end of exposure ( $3.8 \pm 0.5$  M vs.  $2.9 \pm 0.3$  mM;  $p = 0.004$ , unpaired  $t$  test). However, compared to baseline, this difference was not significant ( $p = 0.32$ , one-way ANOVA).



**Figure 2.** Evolution of the antioxidant response after 60 min of mild (30%,  $n = 6$ ) or high hyperoxia (100%,  $n = 8$ ). (A) Total antioxidant capacity (TAC). (B) Superoxide dismutase activity (SOD). (C) Catalase activity (CAT). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents pre-exposure (ns: not significant, \*\*:  $p < 0.01$ ; intragroup one-way ANOVA; intergroup unpaired  $t$  test).

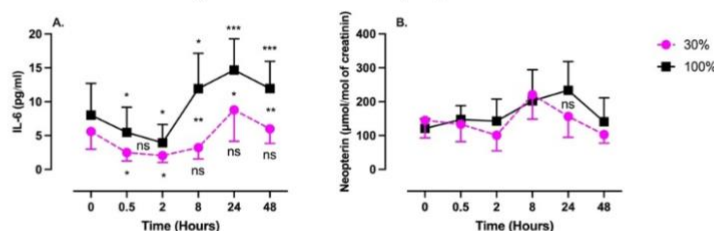
## 2.3. Inflammatory Response (IL-6, Neopterin, Creatinine, and Urates) after One Hour of Oxygen Exposure at a $\text{FiO}_2$ of 30% or 100%

Interleukin 6 (IL-6) was measured in plasma samples, while neopterin, creatinine, and urates were obtained from urine samples (Figure 3).

IL-6 followed a similar pattern in both conditions, although with a late higher amplitude after 100% exposure. It was characterized by a significant decrease in concentration followed by a rebound without returning to the baseline. The nadir was reached after 2 h (30%:  $2.0 \pm 1.0$  pg/mL; 100%:  $3.9 \pm 2.7$  pg/mL;  $p = 0.017$  and  $p = 0.015$ , respectively, one-way ANOVA), while the acme was reached after 24 h (30%:  $8.8 \pm 4.6$  pg/mL; 100%:  $14.7 \pm 2.7$  pg/mL;  $p > 0.99$  and  $p = 0.001$ , respectively, one-way ANOVA).

From 8 h post-exposure and beyond, the two curves significantly diverged (8 h:  $p = 0.001$ ; 24 h:  $p = 0.04$ ; 48 h:  $p = 0.008$ , unpaired  $t$  test).

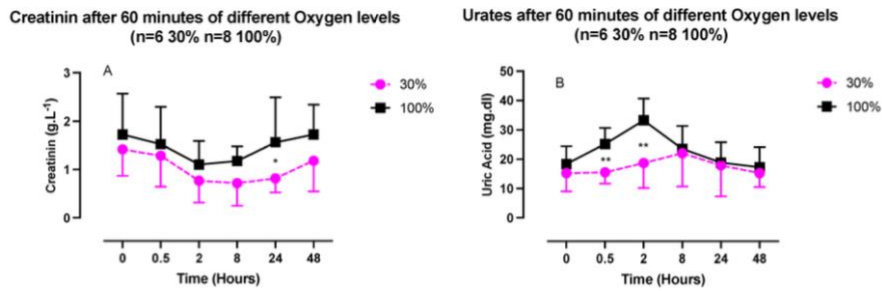
Neopterin exhibited a similar pattern, although the magnitudes of the changes were reduced. These changes were not statistically significant.



**Figure 3.** Evolution of the inflammatory response after 60 min of mild (30%,  $n = 6$ ) or high hyperoxia (100%,  $n = 8$ ). (A) Interleukin-6 (IL-6). (B) Neopterin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents pre-exposure (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ; intragroup: one-way ANOVA; intergroup: unpaired  $t$  test).

Creatinine and urates in urine exhibited opposite U-shaped responses, with a creatinine nadir between 2- and 8-h post-exposure and an urate acme within the same time

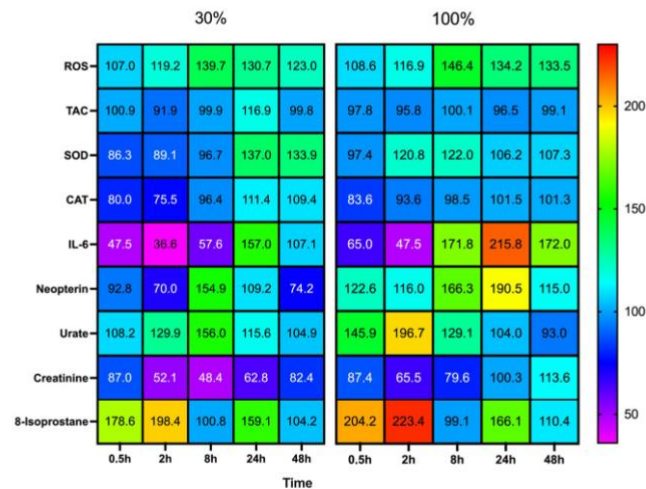
frame (Figure 4), although compared to the baseline, these variations were not statistically significant (one-way ANOVA). There was, however, a significant difference in the urate's kinetics. It was characterized by a stronger initial response after exposure at 100% (30 min: 25.2 ± 5.5 mg/dL vs. 15.5 ± 3.8 mg/dL,  $p = 0.03$ ; and 2 h, 35.2 ± 7.5 mg/dL vs. 18.7 ± 8.5 mg/dL,  $p = 0.005$ ; unpaired  $t$  test).



**Figure 4.** Evolution of urinary markers after 60 min of mild (30%,  $n = 6$ ) or high hyperoxia (100%,  $n = 8$ ). (A) Creatinine. (B) Uric Acid. Results are expressed as mean ± SD. T0 represents pre-exposure (ns: not significant; \*;  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ; intragroup: one-way ANOVA; intergroup: unpaired  $t$  test).

**2.4. Percent of Expressed Proteins and Reactive Oxygen Species (ROS) after One Hour of Oxygen Exposure at a FiO<sub>2</sub> of 30% or 100%**

The magnitude and direction of changes among all results are illustrated in Figure 5.



**Figure 5.** Heat map of percent changes compared to baseline, derived responses after 60 min of mild (30%,  $n = 6$ ) or high hyperoxia (100%,  $n = 8$ ). Each measurement is compared to baseline (T0), which was set at 100%. Results are given as mean change.

**3. Discussion**

Hormesis in mammals is defined as an adaptation capacity to different stresses, which encompasses dynamic processes of repair, recovery, and toxicity that occur over time [30]. At the most basic level, it is mediated through “dose–response” and “dose–time” combinations to oxidative stress, metabolic changes, and inflammation [31]. This is a well-known process in pathological situations [32] or ageing. Indeed, the age-related imbalance between



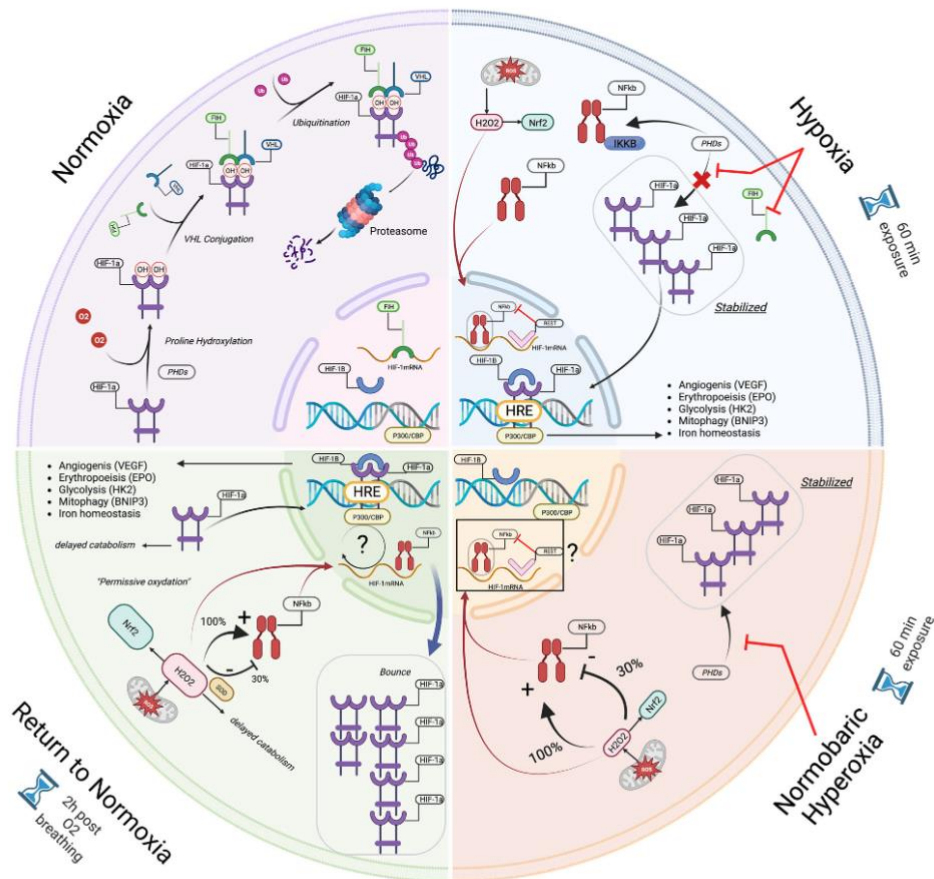
pro- and anti-inflammatory factors is a recognized etiology for metabolic, cardiovascular, and neurodegenerative diseases [33].

Until a decade ago, ROS were thought to cause exclusively toxic effects and were associated with various pathologies [34]; with time, this view has changed, considering that the presence of ROS in cells indicates that ROS production was evolutionarily selected in order to achieve certain useful roles [35]. It is now accepted that biological specificity of ROS action is achieved through the amount, duration, and localization of their production, as we underline in this study.

More recent data have encouraged us to investigate a new paradigm, namely, to consider oxygen as a potent stimulus of molecular complex reactions rather than a simple drug [36].

Several studies exploring the effect of pulsed hyperoxia demonstrated that it is possible to stimulate the production of hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ), which was believed to be expressed only under hypoxic conditions—hence its name.

This phenomenon is called the “normobaric oxygen paradox” [25,26,37] or the “hyperoxic-hypoxic paradox” [24] (for a global view of the mechanisms, see Figure 6).



**Figure 6.** Illustration (created with Biorender.com) of the mechanisms involved during the normobaric oxygen paradox: First, in normoxia, HIF-1 $\alpha$  is constantly produced and destroyed by the intervention

of PHDs and FIH. During hypoxia and intermittent hyperoxia, the stabilization in the cytosol of HIF-1 $\alpha$  protein is improved by repressing the activity of isoforms 1 to 3 of prolyl hydroxylase (PHDs) and of FIH (only in hypoxia), whereas nuclear synthesis is blocked by inhibiting proteins such as REST. Therefore, during these altered oxygen states, immune activation seems to start earlier than antioxidant defenses, allowing subtle kinetics between inflammation and ROS, in their role similar to a “second messenger”. Upon the return to normoxia, the destabilization of HIF-1 $\alpha$  by the intervention of PHD and FIH is delayed by the late activation of antioxidant protection, leaving the cell in a state of “permissive oxidation”. Following this, nuclear synthesis begins earlier, explaining the rebound phenomenon encountered in the production of HIF-1 $\alpha$ . NRF2 and NF- $\kappa$ B are overexpressed after 100%, whereas under 30% only NRF2 is stimulated.

During these interventions, the return to normoxia after mild hyperoxia is sensed as a hypoxic stress without significant NF- $\kappa$ B activation [29]. On the contrary, high and very high hyperoxia induce a shift toward an oxidative stress response, characterized by NRF2 and NF- $\kappa$ B activation in the first 24 h post-exposure. These observations suggest a modulated cellular response to targeted oxygen exposure [29]. This is further confirmed by microparticle expression under different oxygen partial pressures. All tested exposures demonstrated significant elevations of CD41, CD66b, TMEM, and expression and phalloidin binding, except for 1.4 ATA, which elicited the total opposite response with significant decreases of all measured parameters [15].

As shown in previous studies, oxygen breathing induced a hormetic stimulus, eliciting increased ROS production starting from 30 min post-exposure.

Our results suggest that there is no difference in the initial response intensity between the two groups (100% and 30%). However, after the acme, which is reached 8 h post-exposure, the kinetics starts to diverge with a between-group statistical difference at 48 h. In addition, the increase of isoprostanes testifies that the production rate of ROS is already significant enough to produce lipid peroxidation. This must be considered together with the kinetics of the antioxidant response of SOD and CAT.

The absence of an intracellular antioxidant response (CAT and SOD), despite the production of ROS over time, suggests that the cell abides a state of “permissive oxidation” and might be explained by the fact that some diurnal variations are possible and also that some circadian rhythms are opposite in males and females for some antioxidants or enzymes [38]; we may consider that since our group was a mix of males and females, at a given point some concomitant situations may result in non-statistically significant changes.

The significantly higher total antioxidant capacity for a low level of hyperoxia such as 30% recorded at 24 h might be caused by food intake. Furthermore, TAC variations are probably not the most reliable measurement in our experimental setting, given the fact that we followed the participants for 48 h without diet restriction. Some other hyperoxia-induced oxidative stress or transient hypoxia resulting from sleep apnea may also increase myeloid cell recruitment and activation in the lungs. Activated myeloid cells produce myeloperoxidase (MPO), which oxidizes chloride ions to hypochlorous acid, causing oxidative damage and even cell death [39]. This mechanism, even if important, has been analyzed upon prolonged exposures of several days and may not be preminent in our experimental setting.

Our results could be explained by the cellular needs for second messengers, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as mediators likely to act through NRF2 activation, inducing the release of keap1 expression [40]. Although it is now accepted that HIF-1 $\alpha$  is the leading agent in the regulation of homeostasis during hypoxia [41] and hyperoxia [26], other regulating factors must be considered, such as NRF2. For instance, repressor element 1-silencing transcription factor (REST) is a known nuclear inhibitor of HIF-1 $\alpha$  synthesis [42]. During exposure to hypoxia, REST accumulates in the nucleus with a four-fold increase compared to normoxia. This can be quickly reversed by reoxygenation [43].

To the best of our knowledge, the evaluation of REST in hyperoxia has not yet been studied. However, keeping in mind that NOP has the capacity to mimic hypoxia [25,36,44] and is therefore a powerful tool to trigger a hormetic response, it may be used as a reason-

able hypothesis to suggest that the lower the hyperoxia delta, the longer the permissive oxidative state, allowing the secondary cellular messengers [45] to potentiate their nuclear transcription role and trigger a strong and rapid response (within the first 3 h). Indeed, recent data demonstrate epigenetic changes by methylation/demethylation upon gene expression are related to oxygen homeostasis [46]. The kinetics of these oxygen-induced activation/deactivation mechanisms are dependent upon enzymatic reactions where the role of 2-oxoglutarate dioxygenase seems to be decisive [47].

Alternatively, this could be also explained by a slower kinetics of intracellular defenses. Indeed, we have recently demonstrated that after 30% oxygen exposure, the synthesis of glutathione is effective only after 24 h, whereas after exposure at 100%, its synthesis and release occur earlier, approximately 3 h post-exposure [29].

This latter study also demonstrated that the inflammatory response was different between these two conditions (30% and 100%). Exposure at 30% of oxygen was associated with a significant increase in NRF2 without a significant increase in NF- $\kappa$ B, while an exposure at 100% elicited significant activation of inflammatory pathways mediated by NF- $\kappa$ B [29]. Interestingly, our results are consistent with this observation. First, IL-6 expression within the first two hours post-exposure can be explained by synthesis repression related to parallel NRF2 activation [48]. Second, the greater amplitude of IL-6 expression after the exposure at 100% suggests a shift in the cross-linked pathway of NRF2/NF- $\kappa$ B [49]. Although not significant, neopterin shares a similar pattern from inhibition to overexpression with a return to baseline within 24 h. Since this molecule is indicative of a pro-inflammatory with the recruitment of cellular immunity and the induction of apoptosis, its scheme might suggest the possibility that NOP is able to produce immunomodulation. However, to reach significant levels of modulation, more sessions will be needed, as has recently been shown for 30% and 100% FiO<sub>2</sub> after 5 weeks of regular sessions three times per week [11]. Iso-prostane changes are parallel for both exposures, and lipid damage follows ROS production in both percentages (30% and 100%) of administered O<sub>2</sub>.

Other recent data on platelet (CD41a)-, astrocyte (TMEM119)-, and neutrophil (CD66+)-related microparticle release after oxygen exposure (30% and 100%) [15] are consistent with this analysis.

The more potent initial inflammatory response triggered by exposure at 100% is also confirmed based on uric acid measurements. Circulating uric acid is a major aqueous antioxidant in humans, especially for peroxynitrites (ONOO<sup>-</sup>) in the hydrophilic environment. However, uric acid becomes a powerful pro-oxidant under hydrophobic conditions. Uric acid can induce intracellular and mitochondrial oxidative stress and stimulate expression of inflammatory cytokines [30].

Finally, although not significant, the creatinine pattern is consistent with other results of this study, especially ROS and uric acid. Indeed, creatine kinase is inhibited by ROS, especially H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [31], while uric acid acts as an iron chelator in extracellular fluids, which is a co-factor to creatine kinase activity [30]. Evidently, urates may be related to ROS generation (particularly under oxidative stress conditions), for example, when interacting with peroxynitrite, resulting in the formation of active but less reactive products [50].

It can thus be assumed that the observed increase in the ROS level in plasma after moderate hyperoxia (FiO<sub>2</sub> of 30%) is associated not with the elevation of oxidative stress but with the protective mechanism harnessed by the body during the neutralization of highly reactive peroxynitrite with uric acid [51]. The results obtained by Gu et al. also suggest that hyperoxia-induced peroxynitrite formation causes endothelial cell apoptosis, disrupting key survival pathways, and that blocking peroxynitrite formation prevents apoptosis.

#### Limitations

##### Strengths:

- This study is to our knowledge one of the first to tackle the kinetics of responses to a single normobaric oxygen exposure at 30% and 100% of FiO<sub>2</sub>.

- The measurements were conducted until 48 h post exposure and putatively open the door to new possible therapeutic outcomes for oxygen administration protocols.
- The sampling was a standard plasmatic withdrawal, and the analysis is possible in a usual clinical setting without very specialized machinery or procedures.

Weaknesses:

- The number of subjects is limited, but the sample can be considered to be homogenous since all were healthy young students and gender balanced.
- The analysis was not made in the nucleus of the cells but in the plasma; this could be considered a weakness for some, but analysis in the nucleus would need a thoroughly different experimental setting.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Experimental Protocol

Fourteen healthy subjects (7 females and 7 males) volunteered for this study, after approval from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (No. B200-2020-088), and written informed consent was obtained. All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [52].

After medical screening to exclude any comorbidity, participants were prospectively randomized into 2 groups to receive oxygen at different  $\text{FiO}_2$  (Figure 7). As far as age ( $29.9 \pm 11.1$  years old (mean  $\pm$  SD)), height ( $168.2 \pm 9.37$  cm) weight ( $64.4 \pm 12.3$  kg) BMI [ $22.7 \pm 4.1$  kg/m<sup>2</sup>], gender ratio, and health status are concerned, groups were comparable.

Oxygen was administered for 1 h by means of an orofacial nonrebreather mask with a reservoir with care being taken to fit and tighten the mask on the subject's face. The mild hyperoxia group received 30% of oxygen (oxygen partial pressure ( $\text{PO}_2$ ): 0.3 bar; 300 hPa,  $n = 6$ ) from a pressurized gas tank with a gas flow set at 10 L/min, while the high hyperoxia group received 100% of oxygen ( $\text{PO}_2$ : 1.0 bar, 1000 hPa,  $n = 8$ ) from an oxygen concentrator (NewLife Intensity, CAIRE Inc., Ball Ground, GA, USA).

Blood and urine samples were obtained before exposure ( $T_0$ ) and 30 min, 2 h, 8 h, 24 h, and 48 h after the end of oxygen administration.

Each blood sample consisted of approximately 15 mL of venous human blood collected in lithium heparin and EDTA tubes (Vacutainer, BD Diagnostic, Becton Dickinson, Italia S.p.a.). Plasma and red blood cells (RBCs) were separated by centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702R, Darmstadt Germany) at  $1000 \times g$  at 4 °C for 10 min. The samples were then stored in multiple aliquots at  $-80$  °C until assayed; analysis was performed within one month from collection.

Urine was collected by voluntary voiding in a sterile container and stored in multiple aliquots at  $-20$  °C until assayed and thawed only before analysis.

##### 4.2. Blood Sample Analysis

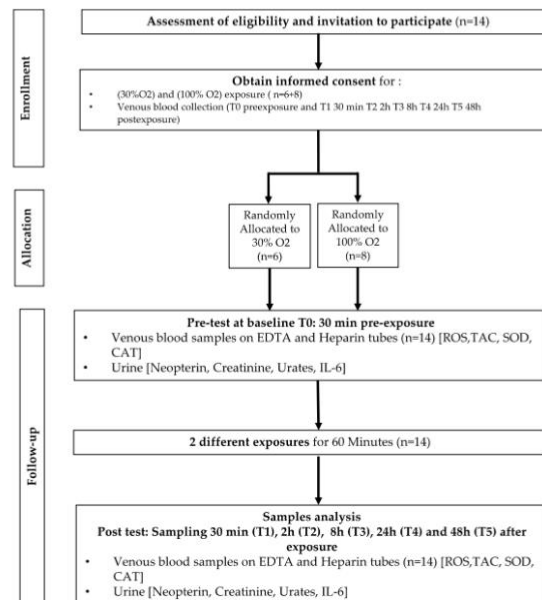
###### 4.2.1. Determination of ROS and TAC by Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

An electron paramagnetic resonance instrument (E-Scan—Bruker BioSpin, GmbH, Rheinstetten, Germany) X-band, with a controller temperature at 37 °C interfaced to the spectrometer, was adopted for ROS production rate and total antioxidant capacity (TAC) as already performed by some of the authors [53–56]. The EPR measurements are highly reproducible, as previously demonstrated [57].

Briefly, for ROS detection, 50  $\mu\text{L}$  of plasma were treated with an equal volume of CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine); then 50  $\mu\text{L}$  of this solution was placed inside a glass EPR capillary tube in the spectrometer cavity for data acquisition. A stable radical CP (3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) was used as an external reference to convert ROS determinations in absolute quantitative values ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). For TAC, we used the spin trap DPPH $\cdot$  (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), a free radical compound soluble and stable in ethanol. All operations were performed in the dark to avoid photochemical effects on DPPH $\cdot$ , and a calibration curve was computed from pure

Trolox-containing reactions. Finally, an equation was used to calculate the anti-oxidant capacity expressed in terms of Trolox equivalent antioxidant capacity (TAC, mM).

All EPR spectra were collected by adopting the same protocol and obtained by using software standardly supplied by Bruker (Billerica, MA, USA) (version 2.11, WinEPR System).



**Figure 7.** Experimental flowchart.

#### 4.2.2. Super-Oxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT)

SOD, CAT plasmatic levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kits) according to the manufacturer's instructions.

SOD activity was assessed by Cayman's SOD assay kit (706002) that utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine.

One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical measured in change in absorbance (450 nm) per minute at 25° and pH 8.0.

CAT activity was assessed by Cayman's assay kit (707002) that utilizes the peroxidic function of CAT. The method is based on the reaction of enzyme with methanol in presence of an optimal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The formaldehyde produced is measured colorimetrically with Purpald (540 nm) as chromogen. One unit of CAT is defined as the amount of enzyme that will cause the formation of 1 nmol of formaldehyde per minute at 25 °C.

All samples and standards were read by a microplate reader spectrophotometer (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

The determinations were assessed in duplicate, and the inter-assay coefficient of variation was in the range indicated by the manufacturer.

#### 4.3. Urine Sample Analysis

##### 4.3.1. Lipid Peroxidation (8-iso-PGF<sub>2</sub>α)

Lipid peroxidation was assessed in urine by competitive immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) measuring 8-isoprostane (8-iso-PGF<sub>2</sub>α) concentration

following the manufacturer's recommendations. Briefly, 50  $\mu$ L of urine was placed in a well plate with mouse monoclonal antibody.

Therefore, 50  $\mu$ L of 8-iso PGF2 $\alpha$ -tracer and 8-iso PGF2 $\alpha$ -antiserum were added and incubated for 18 h at 4  $^{\circ}$ C. After washing with buffer, 200  $\mu$ L of Ellman's reagent containing the substrate of acetylcholinesterase was added.

The 8-iso-PGF2 $\alpha$  concentrations were determined using a standard curve. Samples and standards were spectrophotometrically read at wavelengths between 405 and 420 nm.

#### 4.3.2. Interleukin-6

IL-6 levels were determined using the ELISA assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), based on the double-antibody "sandwich" technique in accordance with the manufacturer's instruction. All the above samples and standards were read by a microplate reader spectrophotometer (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The determinations were assessed in duplicate, and the inter-assay coefficient of variation was in the range indicated by the manufacturer.

#### 4.3.3. Creatinine, Neopterin, and Uric acid Concentrations

Urinary creatinine, neopterin, and uric acid concentrations were measured by the high-pressure liquid chromatography (HPLC) method, as previously described [58], by a Varian instrument (pump 240, autosampler ProStar 410) coupled to a UV-VIS detector (Shimadzu SPD 10-AV,  $\lambda = 240$  nm for creatinine and uric acid; and JASCO FP-1520,  $\lambda_{ex} = 355$  nm and at  $\lambda_{em} = 450$  nm) for neopterin).

After urine centrifugation at 13,000 rpm at 4  $^{\circ}$ C for 5 min, analytic separations were performed at 50  $^{\circ}$ C on a 5  $\mu$ m Discovery C18 analytical column (250  $\times$  4.6 mm I.D., Supelco, Sigma-Aldrich) at a flow rate of 0.9 mL/min. The calibration curves were linear over the range of 0.125–1  $\mu$ mol/L, 0.625–20 mmol/L, and 1.25–10 mmol/L for neopterin, uric acid, and creatinine levels, respectively. The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were <5%.

#### 4.4. Statistical Analysis

The normality of the data was verified by means of the Shapiro–Wilk test, which allowed us to assume a Gaussian distribution. Compared to baseline (T0—pre-exposure), data were analyzed with a one-way ANOVA for repeated measures with Dunnett's post hoc test for intragroup comparison. An unpaired *t* test was used for intergroup comparison. Taking the baseline measures as 100% (T0), percentage or fold changes were calculated for each oxygen protocol, allowing an appreciation of the magnitude of change rather than the absolute values. All data were presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

All statistical tests were performed using a standard computer statistical package, GraphPad Prism version 9.00 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A threshold of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

#### 5. Conclusions

This study suggests a biphasic response over time characterized by an initial "permissive oxidation" followed by the overexpression of inflammation. The antioxidant protection system seems not to be the leading actor in the first place. It corroborates the concept that cellular hormesis is dependent on complex multimodal processes driven by an increase in ROS, inflammation, metabolism, and probably gene expression. This last point needs to be better studied, especially the kinetics of enzymatic reactions related to the expression or repression of intracellular molecular biogenesis, since it is for us important to have sufficient understanding of the exposure/repetition-related leading mechanisms in order to optimize the outcome. This would allow for the definition of proper training and therapeutic or rehabilitation protocols aiming at a more targeted use of oxygen.

**Author Contributions:** All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication. Conceptualization: C.B., P.L., P.G., C.L., S.T., K.L., F.V., S.M.-S., A.V. and A.B.; Investigation: P.L., C.L., S.T., C.B., K.L., P.G., S.M.-S., A.V. and A.B.; Writing: C.L., P.L., C.B., P.G., F.V., S.M.-S., F.G. and S.M.; Funding: C.B., F.V., K.L. and S.T.; Data Analysis: C.L., S.M.-S., A.V., F.V., C.B., P.L., F.G., P.G. and S.M.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This manuscript is part of the DELTO<sub>2</sub>X Project and is funded by WBE (Wallonia-Brussels-Education) Belgium to the Environmental, Occupational, Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), Belgium. The sponsors had no role in the design and conduct of the study; the collection, management, analysis, and interpretation of the data; the preparation, review, or approval of the manuscript; and the decision to submit the manuscript for publication.

**Institutional Review Board Statement:** Ethics Committee approval from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (No. B 200-2020-088).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are available upon request from the authors.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to all volunteer participants, especially to students of the Haute Ecole Bruxelles-Brabant, Motor Sciences Department (Physiotherapy). Special acknowledgment is given to Maristella Gussoni for the accurate and in-depth expert contribution.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

FIH	Factor inhibiting HIF
PHD	Prolyl hydroxylase domain
REST	Repressor Element 1-Silencing Transcription factor
CAT	Catalase
FiO <sub>2</sub>	Inspired fraction of oxygen
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$
IL-6	Interleukin-6
NOP	Normobaric oxygen paradox
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2 Related-Factor 2
PO <sub>2</sub>	Oxygen partial pressure
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TAC	Total antioxidant capacity
HRE	Hypoxia responsive element

#### References

- Poulton, S.W.; Bekker, A.; Cumming, V.M.; Zerkle, A.L.; Canfield, D.E.; Johnston, D.T. A 200-million-year delay in permanent atmospheric oxygenation. *Nature* **2021**, *592*, 232–236. [[CrossRef](#)]
- Bitterman, H. Bench-to-bedside review: Oxygen as a drug. *Crit. Care* **2009**, *13*, 205. [[CrossRef](#)]
- Nakane, M. Biological effects of the oxygen molecule in critically ill patients. *J. Intensive Care* **2020**, *8*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- van Vliet, T.; Demaria, F.C.M. To breathe or not to breathe: Understanding how oxygen sensing contributes to age-related phenotypes. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *67*, 101267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fu, Q.; Duan, R.; Sun, Y.; Li, Q. Hyperbaric oxygen therapy for healthy aging: From mechanisms to therapeutics. *Redox Biol.* **2022**, *53*, 102352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Okada, K.; Mori, D.; Makii, Y.; Nakamoto, H.; Murahashi, Y.; Yano, F.; Chang, S.H.; Taniguchi, Y.; Kobayashi, H.; Semba, H.; et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- $\kappa$ B signaling. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Serebrovska, Z.O.; Serebrovska, T.V.; Kholin, V.A.; Tumanovska, L.V.; Shysh, A.M.; Pashevin, D.A.; Goncharov, S.V.; Stroy, D.; Grib, O.N.; Shatylo, V.B.; et al. Intermittent Hypoxia-Hyperoxia Training Improves Cognitive Function and Decreases Circulating Biomarkers of Alzheimer's Disease in Patients with Mild Cognitive Impairment: A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5405. [[CrossRef](#)]
- Burtscher, J.; Mallet, R.T.; Burtscher, M.; Millet, G.P. Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? *Ageing Res. Rev.* **2021**, *68*, 101343. [[CrossRef](#)]

9. Bestavashvili, A.; Glazachev, O.; Bestavashvili, A.; Suvorov, A.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Rozhkov, A.; Kuznetsova, N.; Pavlov, C.; Glushenkov, D.; et al. Intermittent Hypoxic-Hyperoxic Exposures Effects in Patients with Metabolic Syndrome: Correction of Cardiovascular and Metabolic Profile. *Biomedicines* **2022**, *10*, 566. [\[CrossRef\]](#)
10. Matta, A.; Nader, V.; Lebrin, M.; Gross, F.; Prats, A.C.; Cussac, D.; Galinier, M.; Roncalli, J. Pre-Conditioning Methods and Novel Approaches with Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cardiovascular Disease. *Cells* **2022**, *11*, 1620. [\[CrossRef\]](#)
11. Balestra, C.; Lambrechts, K.; Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Levenez, M.; Germonpre, P.; Virgili, F.; Bosco, G.; Lafere, P. Hypoxic and Hyperoxic Breathing as a Complement to Low-Intensity Physical Exercise Programs: A Proof-of-Principle Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Balestra, C.; Theunissen, S.; Papadopoulou, V.; Le Mener, C.; Germonpre, P.; Guerrero, F.; Lafere, P. Pre-dive Whole-Body Vibration Better Reduces Decompression-Induced Vascular Gas Emboli than Oxygenation or a Combination of Both. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Webb, J.T.; Pilmanis, A.A. Fifty years of decompression sickness research at Brooks AFB, TX: 1960-2010. *Aviat. Space Env. Med.* **2011**, *82* (Suppl. S5), A1–A25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Sannigrahi, P.; Sushree, S.K.; Agarwal, A. Aeromedical Concerns and Lessons Learnt during Oxygen Jump at Dolma Sampa. *Indian J. Aerosp. Med.* **2018**, *62*, 16–20.
15. Balestra, C.; Arya, A.K.; Leveque, C.; Virgili, F.; Germonpre, P.; Lambrechts, K.; Lafere, P.; Thom, S.R. Varying Oxygen Partial Pressure Elicits Blood-Borne Microparticles Expressing Different Cell-Specific Proteins-Toward a Targeted Use of Oxygen? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7888. [\[CrossRef\]](#)
16. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2015.
17. Sies, H.; Belousov, V.V.; Chandel, N.S.; Davies, M.J.; Jones, D.P.; Mann, G.E.; Murphy, M.P.; Yamamoto, M.; Winterbourn, C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 499–515. [\[CrossRef\]](#)
18. La Sala, L.; Tagliabue, E.; Mrakic-Sposta, S.; Uccellatore, A.C.; Senesi, P.; Terruzzi, I.; Trabucchi, E.; Rossi-Bernardi, L.; Luzi, L. Lower miR-21/ROS/HNE levels associate with lower glycemia after habit-intervention: DIAPASON study 1-year later. *Cardiovasc. Diabetol.* **2022**, *21*, 35. [\[CrossRef\]](#)
19. Cova, E.; Pandolfi, L.; Colombo, M.; Frangipane, V.; Inghilleri, S.; Morosini, M.; Mrakic-Sposta, S.; Moretti, S.; Monti, M.; Pignochino, Y.; et al. Pemetrexed-loaded nanoparticles targeted to malignant pleural mesothelioma cells: An in vitro study. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 773–785. [\[CrossRef\]](#)
20. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Maderia, L.; Gregorini, F.; Montorsi, M.; Moretti, S.; Greco, F.; Cova, E.; Gussoni, M. R(+)-Thioctic Acid Effects on Oxidative Stress and Peripheral Neuropathy in Type II Diabetic Patients: Preliminary Results by Electron Paramagnetic Resonance and Electroneurography. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2018*, 1767265. [\[CrossRef\]](#)
21. Calabrese, E.J.; Mattson, M.P. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *NPJ Aging Mech. Dis.* **2017**, *3*, 13. [\[CrossRef\]](#)
22. Lennicke, C.; Cochemé, H.M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol. Cell* **2021**, *81*, 3691–3707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Chelombitko, M.A. Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* **2018**, *73*, 199–202. [\[CrossRef\]](#)
24. Hadanny, A.; Efrati, S. The Hyperoxic-Hypoxic Paradox. *Biomolecules* **2020**, *10*, 958. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Balestra, C.; Germonpre, P.; Poortmans, J.R.; Marroni, A. Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: The "normobaric oxygen paradox". *J. Appl. Physiol.* **2006**, *100*, 512–518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Cimino, F.; Balestra, C.; Germonpre, P.; De Bels, D.; Tillmans, F.; Saija, A.; Speciale, A.; Virgili, F. Pulsed high oxygen induces a hypoxic-like response in human umbilical endothelial cells and in humans. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *113*, 1684–1689. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Khalife, M.; Ben Aziz, M.; Balestra, C.; Valsamis, J.; Sosnowski, M. Physiological and Clinical Impact of Repeated Inhaled Oxygen Variation on Erythropoietin Levels in Patients After Surgery. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 744074. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Lafere, P.; Schubert, T.; De Bels, D.; Germonpre, P.; Balestra, C. Can the normobaric oxygen paradox (NOP) increase reticulocyte count after traumatic hip surgery? *J. Clin. Anesth.* **2013**, *25*, 129–134. [\[CrossRef\]](#)
29. Fratantonio, D.; Virgili, F.; Zucchi, A.; Lambrechts, K.; Latronico, T.; Lafere, P.; Germonpre, P.; Balestra, C. Increasing Oxygen Partial Pressures Induce a Distinct Transcriptional Response in Human PBMC: A Pilot Study on the "Normobaric Oxygen Paradox". *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 458. [\[CrossRef\]](#)
30. Calabrese, E. Hormesis: Path and Progression to Significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2871. [\[CrossRef\]](#)
31. Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244–254. [\[CrossRef\]](#)
32. Franceschi, C.; Campisi, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69* (Suppl. S1), S4–S9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



34. Akhigbe, R.; Ajayi, A. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: A review. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Checa, J.; Aran, J.M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 1057–1073. [[CrossRef](#)]
36. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not "Only" a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rocco, M.; D'Itri, L.; De Bels, D.; Corazza, F.; Balestra, C. The "normobaric oxygen paradox": A new tool for the anesthetist? *Minerva Anestesiol.* **2014**, *80*, 366–372.
38. Bel'skaya, L.V.; Kosenok, V.K.; Sarf, E.A. Chronophysiological features of the normal mineral composition of human saliva. *Arch. Oral. Biol.* **2017**, *82*, 286–292. [[CrossRef](#)]
39. Teng, R.J.; Jing, X.; Martin, D.P.; Hogg, N.; Haefke, A.; Konduri, G.G.; Day, B.W.; Naylor, S.; Pritchard, K.A., Jr. N-acetylsyltyrosylcysteine amide, a novel systems pharmacology agent, reduces bronchopulmonary dysplasia in hyperoxic neonatal rat pups. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *166*, 73–89. [[CrossRef](#)]
40. Chen, C.; He, M.; Li, X.; Yu, L.; Liu, Y.; Yang, Y.; Li, L.; Jia, J.; Li, B. H2O2/DEM-Promoted Maft Promoter Demethylation Drives Nrf2/ARE Activation in Zebrafish. *Life* **2022**, *12*, 1436. [[CrossRef](#)]
41. Semenza, G.L. HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *88*, 1474–1480. [[CrossRef](#)]
42. Cavadas, M.A.S.; Mesnieres, M.; Crifo, B.; Manresa, M.C.; Selfridge, A.C.; Scholz, C.C.; Cummins, E.P.; Cheong, A.; Taylor, C.T. REST mediates resolution of HIF-dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cavadas, M.A.S.; Mesnieres, M.; Crifo, B.; Manresa, M.C.; Selfridge, A.C.; Keogh, C.E.; Fabian, Z.; Scholz, C.C.; Nolan, K.A.; Rocha, L.M.A.; et al. REST is a hypoxia-responsive transcriptional repressor. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. De Bels, D.; Corazza, F.; Germonpre, P.; Balestra, C. The normobaric oxygen paradox: A novel way to administer oxygen as an adjuvant treatment for cancer? *Med. Hypotheses* **2010**, *76*, 467–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sies, H. Role of Metabolic H2O2 Generation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 8735–8741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Basang, Z.; Zhang, S.; Yang, L.; Quzong, D.; Li, Y.; Ma, Y.; Hao, M.; Pu, W.; Liu, X.; Xie, H.; et al. Correlation of DNA methylation patterns to the phenotypic features of Tibetan elite alpinists in extreme hypoxia. *J. Genet. Genom.* **2021**, *48*, 928–935. [[CrossRef](#)]
47. Wilson, J.W.; Shakir, D.; Batie, M.; Frost, M.; Rocha, S. Oxygen-sensing mechanisms in cells. *FEBS J.* **2020**, *287*, 3888–3906. [[CrossRef](#)]
48. Kobayashi, E.H.; Suzuki, T.; Funayama, R.; Nagashima, T.; Hayashi, M.; Sekine, H.; Tanaka, N.; Moriguchi, T.; Motohashi, H.; Nakayama, K.; et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11624. [[CrossRef](#)]
49. Gao, W.; Guo, L.; Yang, Y.; Wang, Y.; Xia, S.; Gong, H.; Zhang, B.K.; Yan, M. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- $\kappa$ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 809952. [[CrossRef](#)]
50. Kuzkaya, N.; Weissmann, N.; Harrison, D.G.; Dikalov, S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem. Pharm.* **2005**, *70*, 343–354. [[CrossRef](#)]
51. Gu, X.; El-Remessy, A.B.; Brooks, S.E.; Al-Shabrawey, M.; Tsai, N.T.; Caldwell, R.B. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2003**, *285*, C546–C554. [[CrossRef](#)]
52. World Medical, A. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194.
53. Mrakic-Spota, S.; Vezzoli, A.; D'Alessandro, F.; Paganini, M.; Dellanoce, C.; Cialoni, D.; Bosco, G. Change in Oxidative Stress Biomarkers During 30 Days in Saturation Dive: A Pilot Study. *Int. J. Env. Res. Public Health* **2020**, *17*, 7118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moretti, S.; Mrakic-Spota, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; et al. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2018**, *9*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Mrakic-Spota, S.; Vezzoli, A.; Rizzato, A.; Della Noce, C.; Malacrida, S.; Montorsi, M.; Paganini, M.; Cancellara, P.; Bosco, G. Oxidative stress assessment in breath-hold diving. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 2449–2456. [[CrossRef](#)]
56. Bosco, G.; Rizzato, A.; Quartesan, S.; Camporesi, E.; Mrakic-Spota, S.; Moretti, S.; Balestra, C.; Rubini, A. Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water. *Undersea Hyperb. Med.* **2018**, *45*, 191–198. [[CrossRef](#)]
57. Mrakic-Spota, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A. A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, *2014*, 306179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Bosco, G.; Paganini, M.; Giacon, T.A.; Oppio, A.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Moro, T.; Paoli, A.; Zanotti, F.; Zavan, B.; et al. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int. J. Env. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9755. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Cinétique de la réponse au stress oxydant après 60 minutes d'expositions à l'hyperoxie hyperbare à différentes pressions (1,4 ATA et 2,5 ATA).

### Résumé :

L'oxygénothérapie hyperbare (HBOT) consiste à inhaler de l'oxygène pur à une pression atmosphérique augmentée. Selon la Société de médecine sous-marine et hyperbare (UHMS), cette pression peut être d'au moins 1,4 atmosphères (ATA) pour toutes les indications approuvées. Les séances durent généralement de 1 à 1,5 heure, répétées quotidiennement, avec des pressions entre 2 et 3 ATA. Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus avec des pressions inférieures (1,5 ATA), les avantages au-delà de 3 ATA sont limités en raison des effets indésirables. La cinétique exacte des espèces réactives de l'oxygène lors de différentes expositions à l'oxygène hyperbare reste incertaine. Cette étude vise à explorer les réponses oxydatives, inflammatoires et enzymatiques après des expositions de 60 minutes à deux niveaux d'oxygène hyperbare (1,4 ATA et 2,5 ATA). Le niveau inférieur a été choisi en raison de son approximation avec l'hyperoxie lors de plongées sous-marines, tandis que le niveau supérieur représente l'exposition thérapeutique courant

Dans cette étude, les réponses métaboliques aux expositions à l'oxygène hyperbare pendant 1 heure à 1,4 et 2,5 ATA ont été étudiées. Quatorze sujets en bonne santé, non-fumeurs (2 femmes et 12 hommes, âge :  $37,3 \pm 12,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart-type), taille :  $176,3 \pm 9,9$  cm, et poids :  $75,8 \pm 17,7$  kg) ont participé à cette étude de manière volontaire. Des échantillons sanguins ont été prélevés avant et à 30 minutes, 2 heures, 24 heures et 48 heures après une exposition hyperbare hyperoxique d'une heure. Le niveau d'oxydation a été évalué par la production de ROS, les métabolites de l'oxyde nitrique (NOx) et les niveaux d'isoprastane. Les réactions antioxydantes ont été mesurées en évaluant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la cystéinylglycine et la glutathion (GSH). La réponse inflammatoire a été mesurée en utilisant l'interleukine-6, la néoptérine et la créatinine. Une courte période (60 minutes) d'hyperoxie hyperbare légère (1,4 ATA) et élevée (2,5 ATA) conduit à une augmentation significative similaire de la production de ROS et des réactions antioxydantes.

Les résultats suggèrent une production similaire de radicaux libres (ROS) malgré des doses d'oxygène différentes, soulignant une cinétique dose-dépendante. La vasoconstriction induite par les ROS est plus prononcée à 2,5 ATA, associée à une augmentation significative de la créatinine. La diminution des métabolites de l'oxyde nitrique suggère une inactivation par les anions superoxydes, contribuant à la vasoconstriction. La catalase (CAT) réagit rapidement au stress oxydatif, avec une augmentation significative et similaire dans les deux conditions, tandis que la superoxyde dismutase (SOD) reste inchangée. Les niveaux accrus de ROS stimulent la production de CAT, conduisant à une modulation de la réponse antioxydante et immunitaire, observée par une augmentation de la neoptérine. La complexité de l'évolution du glutathion suggère une cinétique adaptative aux ROS élaboré. Ces résultats offrent un aperçu des réponses cellulaires à l'oxygène hyperbare, soulignant des différences dose-dépendantes entre les expositions.



Article

# Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different (1.4 ATA and 2.5 ATA) Hyperbaric Hyperoxia Exposures

Clément Leveque<sup>1,2</sup>, Simona Mrakic Sposta<sup>3</sup>, Sigrid Theunissen<sup>1,\*</sup>, Peter Germonpré<sup>4,5</sup>, Kate Lambrechts<sup>1</sup>, Alessandra Vezzoli<sup>3</sup>, Gerardo Bosco<sup>6</sup>, Morgan Lévénéz<sup>1</sup>, Pierre Lafère<sup>1,4</sup>, François Guerrero<sup>2</sup> and Costantino Balestra<sup>1,4,7,8,\*</sup>

- <sup>1</sup> Environmental, Occupational, Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), 1160 Brussels, Belgium; cleveque@he2b.be (C.L.); klambrechts@he2b.be (K.L.); morganlevene@gmail.com (M.L.); plafere@he2b.be (P.L.)
  - <sup>2</sup> Laboratoire ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, UFR Sciences et Techniques, 6 Avenue Le Gorgeu, 93837 Brest, France; francois.guerrero@univ-brest.fr
  - <sup>3</sup> Institute of Clinical Physiology, National Research Council (CNR), 20162 Milan, Italy; simona.mrakicsposta@cnr.it (S.M.S.); alessandra.vezzoli@cnr.it (A.V.)
  - <sup>4</sup> DAN Europe Research Division (Roseto-Brussels), 1160 Brussels, Belgium; pgermonpre@gmail.com
  - <sup>5</sup> Hyperbaric Centre, Queen Astrid Military Hospital, 1120 Brussels, Belgium
  - <sup>6</sup> Environmental Physiology & Medicine Lab, Department of Biomedical Sciences, University of Padova, 35131 Padova, Italy; gerardo.bosco@unipd.it
  - <sup>7</sup> Anatomical Research and Clinical Studies, Vrije Universiteit Brussels (VUB), 1090 Brussels, Belgium
  - <sup>8</sup> Physical Activity Teaching Unit, Motor Sciences Department, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium
- \* Correspondence: sigtheunissen@he2b.be (S.T.); costantino.balestra@ulb.be (C.B.)



**Citation:** Leveque, C.; Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Bosco, G.; Lévénéz, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different (1.4 ATA and 2.5 ATA) Hyperbaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12361. <https://doi.org/10.3390/ijms241512361>

Academic Editor: Michele Samaja

Received: 30 June 2023

Revised: 25 July 2023

Accepted: 1 August 2023

Published: 2 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a therapeutic approach based on exposure to pure oxygen in an augmented atmospheric pressure. Although it has been used for years, the exact kinetics of the reactive oxygen species (ROS) between different pressures of hyperbaric oxygen exposure are still not clearly evidenced. In this study, the metabolic responses of hyperbaric hyperoxia exposures for 1 h at 1.4 and 2.5 ATA were investigated. Fourteen healthy non-smoking subjects (2 females and 12 males, age:  $37.3 \pm 12.7$  years old (mean  $\pm$  SD), height:  $176.3 \pm 9.9$  cm, and weight:  $75.8 \pm 17.7$  kg) volunteered for this study. Blood samples were taken before and at 30 min, 2 h, 24 h, and 48 h after a 1 h hyperbaric hyperoxic exposure. The level of oxidation was evaluated by the rate of ROS production, nitric oxide metabolites (NOx), and the levels of isoprostane. Antioxidant reactions were assessed through measuring superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), cysteinylglycine, and glutathione (GSH). The inflammatory response was measured using interleukine-6, neopterin, and creatinine. A short (60 min) period of mild (1.4 ATA) and high (2.5 ATA) hyperbaric hyperoxia leads to a similar significant increase in the production of ROS and antioxidant reactions. Immunomodulation and inflammatory responses, on the contrary, respond proportionally to the hyperbaric oxygen dose. Further research is warranted on the dose and the inter-dose recovery time to optimize the potential therapeutic benefits of this promising intervention.

**Keywords:** oxygen biology; cellular reactions; human; oxygen therapy; human performance; hyperbaric oxygen therapy; oxygen dose

## 1. Introduction

Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a therapeutic approach based on breathing pure oxygen (O<sub>2</sub>) in an augmented atmospheric pressure. According to the Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS), this pressure may equal or exceed 1.4 atmospheres (ATA). However, all current UHMS-approved indications require that patients breathe near 100% oxygen while enclosed in a chamber pressurized to a minimum of 2 ATA (<https://www.uhms.org/resources/hbo-indications.html>) (accessed on 30 June 2023).

Depending on the protocol, the duration of a single session varies from 1 to 1.5 h (without considering the time needed to reach the intended pressure, which may take up to 15 min for pressurization and 15 min for depressurization), the repetition of exposures varies from one to three times daily, with 20 to 60 therapeutical doses to be administered depending on the condition [1]. Frequently, this method utilizes pressures between 2 to 3 ATA. Nevertheless, promising results have also been obtained for certain conditions with pressures less than 2 ATA (1.5 ATA) [2,3], and in some studies, even 'hyperbaric air' seems to be of interest [4]. While some protocols accept the use of 6 ATA (e.g., for the treatment of gas embolism), little benefit is usually reported from pressures above 3 ATA as this may be associated with a plethora of adverse effects [5].

Although it has been used for years, the exact kinetics of the reactive oxygen species between different levels of hyperbaric oxygen exposure are still not clearly evidenced and, without much scientific evidence, it is common practice to apply HBOT sessions every 24 h [6]. The need for several sessions to reach a relevant effect is likewise commonly accepted; however, the optimal hyperbaric oxygen levels and the time needed between each session to optimize cellular responses—such as Hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) or nuclear factor kappa  $\beta$  (NF- $\kappa$  $\beta$ ), erythroid related factor 2 (NRF2), cellular vesicles and microparticles, Caspase 3 [7–10]—are still debated and stand solely on observational clinical outcomes. Some recent experimental works have been evaluating the effects of different levels of oxygen on oxidative stress under hypoxic [11–14], normobaric hyperoxic [15–17], and hyperbaric hyperoxic [4,6–8] conditions. The encouraging, but also challenging, results lead even to question if some oxygen levels formerly considered as 'HBOT sham' [18] may be of therapeutic interest [4,7].

The purpose of this study was to investigate oxidative, inflammatory, and enzymatic reactions following exposures for 60 min at two different (mild or high) levels of hyperbaric oxygen, 1.4 ATA and 2.5 ATA.

The lower level (1.4 ATA) was chosen because it approaches the level of hyperoxia that may be reached during some underwater diving exposures but also because the therapeutical use of such lower oxygen pressures is being debated. The higher level of hyperbaric hyperoxia is the common average therapeutical exposure.

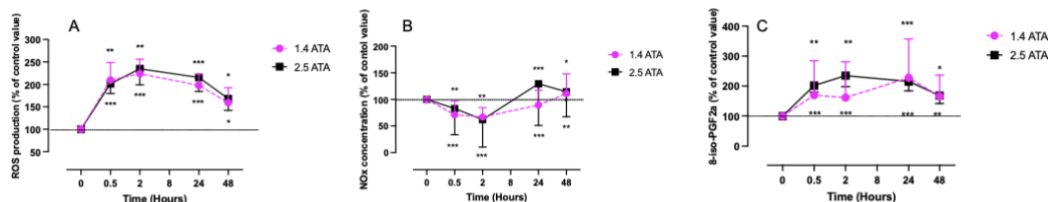
## 2. Results

### 2.1. ROS, NOx, and 8-Isoprostane (8-Iso-PGF2 $\alpha$ ) Levels after One Hour of Oxygen Exposure at 1.4 and 2.5 ATA

Both oxygen exposures, mild (1.4 ATA) and high (2.5 ATA), elicited a significant increase of plasmatic ROS production rate with a similar kinetic of rise and decrease. Both oxygen exposures induced a significant increase in ROS production with a peak after 2 h ( $0.408 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  at 1.4 ATA compared to the baseline,  $p < 0.001$ ; and  $0.406 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$  at 2.5 ATA,  $p < 0.01$ ). Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows a non-significant difference between the two groups ( $F(4, 52) = 0.86$ ;  $p = 0.490$ ) (Figure 1A). This peak plateaus for about 2 h, and then the quantity of ROS decreases slowly until 48 h without returning to control levels.

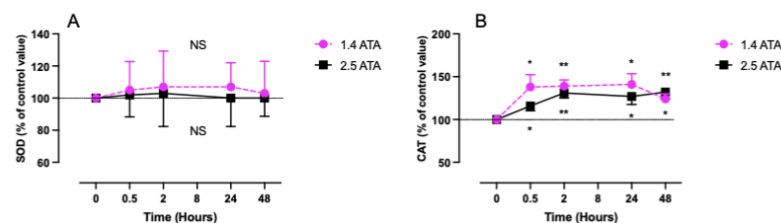
Nitric oxide metabolites (Figure 1B) show changes characterized by a significant decrease; they are the lowest after 2 h for both 1.4 ATA ( $175.4 \pm 45.62 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) and 2.5 ATA ( $235.1 \pm 121 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). We observed a reactive increase of nitric oxide metabolites 24 h after 2.5 ATA exposure ( $496.9 \pm 249 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows a non-significant difference between the two groups ( $F(4, 52) = 0.855$ ;  $p = 0.497$ ).

For 8-isoprostane (pg/mg creatinine) (Figure 1C), a faster increase after the 2.5 ATA exposure is present compared to the 1.4 ATA exposure. These changes reach a peak plateau 2 h after 2.5 ATA ( $541 \pm 2.02 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine,  $p < 0.01$ ) and around 24 h after 1.4 ATA ( $560.2 \pm 2.09 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$  creatinine,  $p < 0.001$ ). Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows a non-significant difference between the two groups ( $F(4, 52) = 0.905$ ;  $p = 0.468$ ).



**Figure 1.** Evolution of ROS (plasma) production rate (A), NOx (urine) (B), and 8-iso-PGF2a (urine) (C) after 60 min of mild (1.4 ATA,  $n = 6$ ) or high hyperbaric exposure (2.5 ATA,  $n = 8$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SD as a percentage of the control value. T0 represents pre-exposure baseline (ROS:  $0.18 \pm 0.016 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ) (Nox:  $265.7 \pm 43.76 \mu\text{M}$ ) (8-iso-PGF2a:  $286 \pm 124$ ). Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 1.4 and 2.5 ATA exposure when significant are shown between the 2 curves (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Unexpectedly, SOD concentration did not show any change during the 48 h following expositions (Figure 2A). Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows a non-significant difference between the two groups ( $F(4, 56) = 0.0266$ ;  $p = 0.999$ ), contrary to the CAT levels that increase rapidly after both exposures (1.4 ATA after 30 min:  $32.92 \pm 11.04 \mu\text{g}/\mu\text{ml}$ ,  $p < 0.05$ ; 2.5 ATA after 2 h:  $32.62 \pm 5.97$ ,  $p < 0.01$ ), whereas two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows again a non-significant difference between the two groups ( $F(4, 52) = 2.47$ ;  $p = 0.056$ ) (Figure 2B). This increase remained constant during the 48 h following both exposures.



**Figure 2.** Evolution of SOD (plasma) (A) and CAT (B), after 60 min of mild (1.4 ATA,  $n = 6$ ) or high hyperbaric exposure (2.5 ATA,  $n = 8$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SD as a percentage of the control value. T0 represents pre-exposure baseline (SOD:  $3 \pm 1.9 \text{ U/mL}$ ) (CAT:  $24 \pm 5.3 \text{ U/mL}$ ). Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 1.4 and 2.5 ATA exposure when significant are shown between the 2 curves (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).

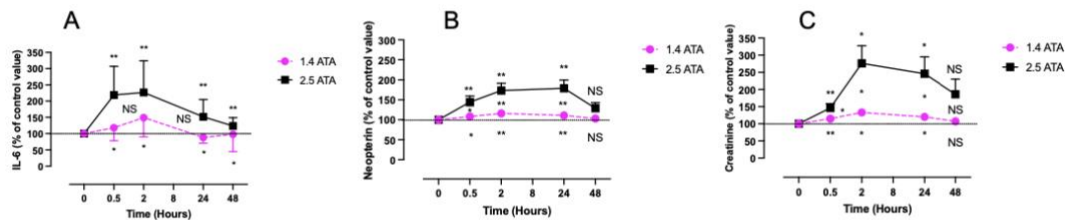
## 2.2. Inflammatory Response (IL-6, Neopterin and Creatinine) after One Hour of Oxygen Exposure at 1.4 and 2.5 ATA

Interleukin 6 (IL-6) was measured in plasma samples while neopterin and creatinine were obtained from urine (Figure 3A).

IL-6 shows a significant increase compared to the baseline, presenting its peak at 2 h for the 1.4 ATA group ( $3.82 \pm 0.92 \text{ pg/mL}$ ;  $p < 0.05$ ) as well as for the 2.5 ATA group ( $3.36 \pm 2.31 \text{ pg/mL}$ ;  $p < 0.01$ ). Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows a non-significant difference between the two groups at any time ( $F(4, 48) = 0.390$ ;  $p = 0.815$ ).

Although neopterin rose in both groups, this increase was significantly more pronounced after the 2.5 ATA exposure with a peak at 2 h ( $83.58 \pm 20 \mu\text{mol/mol}$  creatinine;  $p < 0.01$ ). This is confirmed by the two-way ANOVA (time exposure  $\times$  oxygen level) of  $F(4, 56) = 5.32$ ;  $p = 0.001$ . The plateau was also reached after 2 h in the 1.4 ATA group

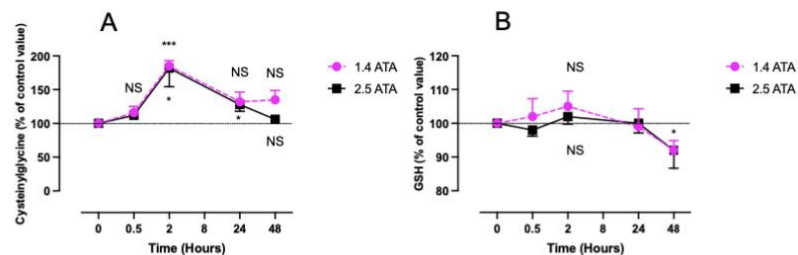
( $57.28 \pm 20.8 \mu\text{mol/mol}$  creatinine;  $p < 0.01$ ). In both groups, values returned to normal after 48 h (Figure 3B).



**Figure 3.** Evolution of the inflammatory response (urine) (IL-6 in (A), neopterin in (B), and creatinine in (C)) after 60 min of mild (1.4 ATA,  $n = 6$ ) or high hyperbaric exposure (2.5 ATA,  $n = 8$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  SD as a percentage of the control value. T0 represents pre-exposure baseline (IL-6:  $2.818 \pm 1.028 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; neopterin:  $49.62 \pm 17.79 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; creatinine:  $1.1 \pm 0.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 1.4 and 2.5 ATA exposure when significant are shown between the 2 curves (ns: not significant; \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ ).

Similar to neopterin, creatinine (Figure 3C) increased in both groups with a significantly remarkable effect after the 2.5 ATA exposure (2 h post 1.4 ATA:  $1.31 \pm 0.66 \text{ g/L}$ ;  $p < 0.01$  vs. 2 h at 2.5 ATA:  $2.52 \pm 0.67 \text{ g/L}$ ;  $p < 0.01$ ), with a return to the baseline after 48 h. Two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level) shows  $F(4, 56) = 3.43$ ;  $p = 0.014$ .

Cysteinylglycine levels increased rapidly 2 h after 1.4 ATA exposure ( $11 \pm 3.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ) and 2.5 ATA ( $8.1 \pm 3.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $p < 0.001$ ). Values returned to the baseline after 24 h in the 1.4 ATA group and later and after 48 h in the 2.5 ATA group (Figure 4A). We did not observe significant changes in both groups with two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level):  $F(4, 48) = 0.498$ ;  $p = 0.737$ .



**Figure 4.** Evolution of cysteinylglycine (plasma) and glutathione (RBC) (GSH) after 60 min of mild (1.4 ATA,  $n = 6$ ) or high hyperbaric hyperoxia (2.5 ATA,  $n = 8$ ). Cysteinylglycine (A) and glutathione (GSH) (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. T0 represents baseline pre-exposure values (cysteinylglycine:  $38.19 \pm 5.715 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; GSH:  $894.7 \pm 176.4 \mu\text{M}$ ). Intra-group comparisons between results at T0 and each other time point are represented above and below the respective curves. Inter-group comparisons between 1.4 ATA and 2.5 ATA of oxygen exposure when significant are shown between the 2 curves (ns: not significant; \*,  $p < 0.05$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

We did not observe any significant changes of glutathione concentrations (GSH), except for a slight decrease 48 h after a 2.5 ATA exposure ( $918.5 \pm 171 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ), and this is confirmed by two-way ANOVA (time post exposure  $\times$  oxygen level):  $F(4, 48) = 0.268$ ;  $p = 0.897$  (Figure 4B).

### 3. Discussion

Our study is, to the best of our knowledge, the first to compare the kinetics of a one-hour exposure to mild (1.4 ATA) and high (2.5 ATA) hyperbaric oxygen dose in healthy subjects.

Based on very recent data, we were motivated to explore a new perspective, which involves viewing oxygen not merely as a conventional drug but rather as a powerful trigger for complex molecular reactions [19]. Fundamentally, this process operates through the concepts of 'dose-response' and 'dose-time', inducing various effects such as oxidative stress, metabolic alterations, and inflammation [20], a phenomenon widely recognized in pathological conditions [21].

Just a decade ago, reactive oxygen species (ROS) were primarily believed to induce harmful effects and were only linked to various pathological conditions [22]. Over time, this perspective shifted, and it was recognized that the presence of reactive oxygen species (ROS) in cells suggests that their production may trigger specific beneficial effects [23]. Our results seem to confirm the reality of such effects at these levels of oxygen breathing.

Firstly, we observed a similar kinetic of plasma reactive oxygen species (ROS) at 1.4 ATA (140 kPa) and 2.5 ATA (250 kPa). The peak production is reached at around 2 h and remains above the baseline level for 48 h. This similar evolution of ROS between the two exposures is an intriguing observation, which suggests that despite the very different oxygen dose, comparable rates of ROS production occur (this is statistically confirmed by two-way ANOVA). Our results apparently contradict a recent study that assessed the effect of HBOT on oxidative markers and immune response [6]. Indeed, in this study, no significant modification of plasma ROS was found following a single HBOT session of 75 min of breathing 100% oxygen through a tight-fitting facemask at a pressure of 240 kPa (2.4 ATA) with two 5 min 'air-breaks' (breathing normal air) and a 10 min pressure reduction. Our protocol involved a 60 min exposure at 1.4 ATA and 2.5 ATA with 100% oxygen without any 'air-breaks'. Although slightly different, our protocol demonstrates a significant increase of ROS production already 30 min after the end of the exposure. While it may be possible that the 'air-breaks' that were performed (twice for 5 min) were sufficient to drastically reduce oxidative stress, our results are not able to confirm this hypothesis. More research with a different experimental setup would be needed to assess this difference [24].

Secondly, we observed an increase in creatinine levels; these may be due probably to the vasoconstriction of renal afferent arterioles caused by reactive oxygen species (ROS); this constriction is more pronounced (significant two-way ANOVA) for the higher oxygen exposure (2.5 ATA). The peak of the creatinine increase occurs when nitric oxide metabolite (NOx) levels are at their lowest (in both exposures). This suggests the following mechanism: during hyperoxic exposure, the induced vasoconstriction reduces renal or other organs' in-flow of blood. This decrease in blood in-flow reduces shear stress and, consequently, the production of nitric oxide (NO). Concomitantly, the bioavailability of NO is reduced by the presence of ROS that exert a scavenging action, given the fact that there are no enzymatic mechanisms for NO inactivation, while its biological life after synthesis in vessels depends on reactions with hemoglobin in the blood, tissue thiols, molecular oxygen, and the superoxide anion. In conditions of extreme hyperoxia, when there is a sharp increase in the production of superoxide anions, existing NO can be neutralized by  $O_2^{\bullet-}$ , leading to decreases in its tissue condition, a weakening of its basal vasorelaxing action, and thus to the development of vasoconstriction. Verification of this hypothesis was addressed some years ago by the Demchenko team by analyzing changes in brain blood flow in response to alterations in the balance between NO and  $O_2^{\bullet-}$  in the brain using hyperbaric oxygenation, an intravenous administration of superoxide dismutase, and an inhibition of NO synthase. The vasodilatory effect of superoxide dismutase in hyperbaric oxygenation was not seen in animals given prior doses of the NO synthase inhibitor [25]. These results provide evidence that one mechanism for hyperoxic vasoconstriction in the brain consists of the inactivation of NO by superoxide anions, decreasing its basal vasorelaxing action.

In fact, during the hyperbaric sessions, without physical activity, only vasoconstriction is present, shear stress is reduced, and a laminar flow is favored.

Under fully developed laminar flow conditions, much of the released NO/nitrite remains concentrated in near-wall fluid laminae, in which nitrite levels can accumulate to vasoactive concentrations in downstream resistance vessels. This local synthesis and delivery minimizes the washout (wasting) of endogenous NO [26]. The resulting vasodilation lowers regional vascular resistance and, in turn, increases regional blood flow as well as wall shear stress in the parent branches, which finally creates a positive feedback effect that causes further local arterial NO release [27]. A certain quantity of NO would thus be 'non-circulating' during the HBOT session, explaining the NOx reduction measured directly after hyperbaric oxygen exposure.

We may then hypothesize that after the hyperbaric session, the locally present NO will be released in circulation because of the normal 'everyday-life' physical activity, and this could explain its rebound increase after 24 h, persisting up to 48 h. Our results confirm a previous study that did not find a systemic increase in NO during hyperbaric oxygen exposures [28].

The increase in reactive oxygen species (ROS) stimulates catalase (CAT) to initiate the breakdown of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> [26]. In contrast to normobaric hyperoxia [17], our study highlights an increase in CAT production in response to oxidative stress. It is worth noting that CAT exhibits one of the highest turnover rates among known enzymes, with approximately 40,000,000 molecules per second [29,30]. Unlike other peroxidases, CAT does not generate free radicals. Paradoxically, oxidative stress induced by hypoxia appears to be more difficult to cope with than hyperoxia-induced oxidative stress [12].

Generally, as a response, an increased rate of radical production leads to an increment in the levels of antioxidant enzymes; in fact, CAT showed an increased activity very fast after the 1 h HBO exposure. SOD activity apparently remained unchanged at the end of the HBO session and for the next 48 h (no difference for the two-way ANOVA for time post exposure X oxygen level). Interestingly, at the time of the 15th treatment, a significant decrement in SOD and CAT activities (−20% each) was observed compared to the 1st HBO exposure [31]. Other authors found different results showing no variation even after the 20th hyperbaric session [32]. We do not have a definite explanation for this apparent contradiction, but it has been proposed that most likely, the species involved in SOD and CAT inactivation is singlet oxygen and that following several hyperbaric sessions, the protective reactions against this reactive species may vary.

This stress response includes the transcriptional activation of various genes encoding antioxidant and detoxification enzymes as an attempt to dampen the deleterious effects of increased ROS production. Neutrophils could release antioxidant enzymes and particularly CAT into the extracellular space in order to increase the antioxidant effect surrounding the neutrophil. This secretion could be important to avoid oxidative damage in tissues induced by neutrophil ROS generation. Previous studies showed that CAT is colocalized to the specific granules with peroxisomal and lysosomal proteins such as MPO, hydrolases, and peroxidases [33]. Sureda and coworkers [34] observed that the presence of CAT in these granules, in addition to the detected increase in extracellular CAT activity after neutrophil activation, agrees with the possible existence of antioxidant enzymes released from neutrophils.

This can explain the increase of plasmatic CAT, and this is further confirmed by other results showing an activation of the immune system with the significant increase of neopterin and creatinine. It is worth underlining that the two-way ANOVA calculations for the oxygen pressure exposure show a difference in both parameters. This seems to show that oxygen levels have a selective effect on the immune response, which could have been further confirmed if the CAT difference was significant for both exposures; but the two-way ANOVA did not quite reach a level of significance ( $p = 0.056$ ).

If we consider other antioxidant actors, glutathione (GSH) evolution is somehow complex. Following one of its metabolites, cysteinylglycine (CYSGLY), we see a significant



increase 2 h after exposure for both oxygen levels (though it is non-significant for oxygen pressure and time post exposure, according to the two-way ANOVA test). This increase is not paralleled by a GSH decrease. We understand this situation as a growing activity of GSH until 2 h post-oxygen. After this peak, a reduction of its metabolite (CYSGLY) is present until 48 h, where basal levels are again reached (both exposures). This decrease of GSH (48 h after exposure) can be interpreted either as a reduction of its production or as an inability of the GSH production to keep up with the ROS still present.

This latter explanation may be the reason behind the mitochondrial dysfunction present (at least) during the first hyperbaric exposures [35]. Indeed, animal studies show a reduction of the mitochondrial membrane rest potential during the first one to five treatments which stimulates the mitochondrial apoptotic pathway and stimulates reactive biogenesis during the following treatments [28,36].

Contrary to our previous results on normobaric hyperoxia, we observed a direct increase in IL-6, suggesting a stimulation of the NFR2/NF-K $\beta$  pathway [37,38]. Additionally, we observe a simultaneous increase in neopterin production, indicating an immunomodulatory role of hyperbaric hyperoxia [39]. Neopterin is generated in response to a  $\gamma$ -interferon-mediated activation of monocytes and macrophages and thus is a direct product of immune system activation [40,41]. Neopterin has been shown to elicit a cytoprotective action of cerebral tissue [42]. This provides an additional argument regarding the effects of hyperbaric hyperoxia exposure on cognitive improvements [43], and remarkably, both exposure levels show a significant increase but with a higher effect for 2.5 ATA.

This fact seems to show a dose–response effect that will encourage further research on the targeted use of oxygen exposures since, for instance, in lower hyperoxia levels (30% and 100% of FiO<sub>2</sub>), no such increase is observed [17], but it is present during moderate hypoxia (15% of FiO<sub>2</sub>) [12]. One other factor to consider is that cellular responses to oxygen are not necessarily directly proportional to the inspired level of oxygen, as there is not a linear relationship between alveolar oxygen pressures and the quantity of molecular oxygen at the cellular (and mitochondrial) level [19]. Factors such as pulmonary gas transfer efficiency, arterial wall thickness and endothelial ‘health’, and capillary-to-cell distance (as with an increased extravascular fluid compartment, e.g., local oedema or lower capillary density in sclerotic tissue) will all play a role in determining how the inspired oxygen pressure ‘translates’ to an increased or decreased cellular presence of molecular oxygen. Even though the observed effects may not directly be extrapolated to non-healthy patients, our observations in young healthy volunteers offer a clue to the dynamic and kinetics of oxygen-mediated cellular reactions. They show that depending on the oxygen level breathed, some effects are similar while others are markedly different; each observed effect clearly has its own ‘dose-dependent’ kinetic.

#### Limitations

##### Strengths:

- This study is, to our knowledge, one of the first to investigate the kinetics of responses to a single short hyperbaric oxygen exposure at 1.4 ATA and 2.5 ATA.
- The measurements were conducted until 48 h post-exposure and putatively open the avenue to new possible applications for hyperbaric oxygen breathing protocols.

##### Weaknesses:

- The subject numbers are limited, but the sample can be considered as homogenous since all were healthy participants.
- The analysis was not made in the nucleus of the cells but in the plasma, red blood cells, or urine; this could be considered a weakness for some, but it would need a thoroughly different experimental setting.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Experimental Protocol

After written informed consent, 48 healthy non-smoking Caucasian subjects (32 males and 16 females) volunteered for this study. None of them had a history of previous cardiac abnormalities or were under any cardio or vaso-active medication.

All experimental procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [44] and approved by the Ethics Committee approval from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (N° B200-2020-088).

After medical screening to exclude any latent morbidity, participants were prospectively randomized into 6 groups of 6–8 persons each. These groups were divided into hypoxia (10% and 15% of FiO<sub>2</sub>) [12], normobaric hyperoxia (30% and 100% of FiO<sub>2</sub>) [7], and hyperbaric hyperoxia (1.4 ATA and 2.5 ATA). All participants were asked to refrain from strenuous exercise for 48 h before the tests. No antioxidant nutrients, i.e., dark chocolate, red wine, or green tea were permitted in the 8 h preceding and during the study. The subjects were also asked not to dive 48 h before the experiment and not to fly within 72 h before the experiment.

Fourteen participants completed the mild hyperbaric hyperoxia (1.4 ATA, n = 6) and high hyperbaric hyperoxia (2.5 ATA, n = 8) protocols. Age (1.4 ATA: 36.0 ± 12.3 years old (mean ± SD) vs. 2.5 ATA: 38.3 ± 13.6 years old; *p* = 0.75), height (1.4 ATA: 174.2 ± 13.4 cm vs. 2.5 ATA: 177.9 ± 6.9 cm; *p* = 0.51), and weight (1.4 ATA: 67.7 ± 13.0 kg vs. 2.5 ATA: 81.8 ± 19.0 kg; *p* = 0.14) were collected.

Hyperbaric oxygen (oxygen partial pressure: 1.4 ATA; 1400 hPa, n = 6, and 2.5 bar; 2500 hPa, n = 8) was administered for 1 h in a hyperbaric multiplace chamber (Haux-Starmed 2800, Haux-Life-Support GmbH, Karlsbad-Ittersbach, Germany) of the Military Hospital Brussels, Belgium, by means of a tight-fitting orofacial mask connected to the Haux-Oxymaster demand-valve system. A 60 min time was chosen to reduce the risk of oxygen toxicity.

Blood and urine samples were obtained before exposure (T0) and 30 min, 2 h, 24 h, and 48 h after the end of oxygen administration. The originally planned and accepted protocol included blood sampling 8 h after exposure (see experimental flowchart—Figure 5); for technical reasons, this could not be achieved, but to be consistent with our previous works and also to better depict the sampling duration, we kept this time point in the graphs' X-axis. Previous experiments have shown that cellular responses after different oxidative exposures may continue for 24 h and even more; we therefore decided to take blood samples up to 48 h [8,10,13,45].

Each blood sample consisted of approximately 15 mL of venous human blood collected in lithium heparin and EDTA tubes (Vacutainer, BD Diagnostic, Becton Dickinson, Italia S.p.A., Milan, Italy). Plasma and red blood cells (RBCs) were separated by centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5702R, Darmstadt, Germany) at 1000× *g* at 4 °C for 10 min. The samples of blood cells and plasma were then stored in multiple aliquots at −80 °C until assayed and thawed; an analysis was performed within one month from collection. Urine was collected by voluntary voiding in a sterile container and stored in multiple aliquots at −20 °C until assayed and thawed only before analysis.

### 4.2. Blood Sample Analysis

#### 4.2.1. Determination of ROS by Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

An electron paramagnetic resonance instrument (E-Scan—Bruker BioSpin, GmbH, Rheinstetten, Germany) X-band, with a controller temperature at 37 °C interfaced to the spectrometer, was adopted for the ROS production rate, as already performed by some of the authors herein [46–49]. The EPR measurements are highly reproducible, as previously demonstrated [50]. EPR is the only non-invasive technique suitable for a direct and quantitative measure of ROS. In particular, the spectroscopic technique (EPRS) finds many fields of application, among which is bio-medicine [51]. The reliability and

reproducibility of EPR data obtained by the herein adopted micro-invasive EPR method has been already reported previously [52].

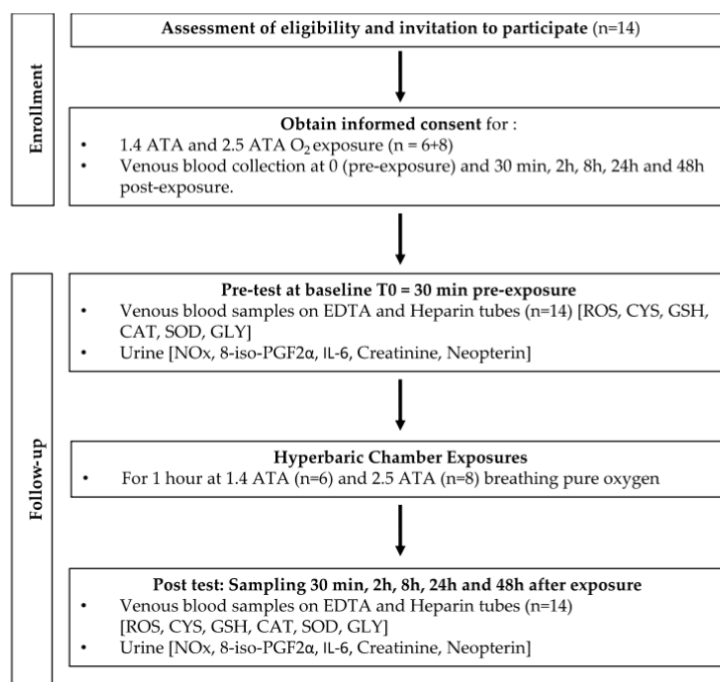


Figure 5. Experimental flowchart.

Briefly, for ROS detection, 50  $\mu\text{L}$  of plasma were treated with an equal volume of CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine), and then 1 mM of the CMH solution was prepared in a buffer (Krebs-Hepes buffer (KHB) containing a 25  $\mu\text{M}$  deferoxamine methane-sulfonate salt (DF) chelating agent and 5  $\mu\text{M}$  sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (DETC)) at pH 7.4. The plasma was incubated with CMH (1:1) for 60 s; 50  $\mu\text{L}$  of this solution were placed inside a glass EPR capillary tube in the spectrometer cavity for data acquisition. A stable radical CP (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) was used as an external reference to convert ROS determinations in absolute quantitative values ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ). All EPR spectra were collected by adopting the same protocol and obtained by using software standardly supplied by Bruker (Billerica, MA, USA) (version 2.11, WinEPR System).

#### 4.2.2. Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT)

SOD and CAT plasmatic levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA kits), according to the manufacturer's instructions. SOD activity was assessed by Cayman's SOD assay kit (706002) that utilizes a tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine. One unit of SOD is defined as the amount of enzymes needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical measured in changes in absorbance (450 nm) per minute at 25  $^{\circ}\text{C}$  and at pH 8.0. CAT activity was assessed by Cayman's assay kit (707002) that utilizes the peroxidic function of CAT. The method is based on the reaction of enzymes with methanol in the presence of an optimal concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The formaldehyde produced is measured colorimetrically with Purpald (540 nm) as chromogen. One unit of CAT is defined as the amount of enzymes

that will cause the formation of 1 nmol of formaldehyde per minute at 25 °C. All samples and standards were read by a microplate reader spectrophotometer (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The determinations were assessed in duplicate, and the inter-assay coefficient of variation was in the range indicated by the manufacturer.

#### 4.2.3. Total Amino Thiols (CYS: Cysteine; CYSGLY: Cysteinylglycine and GSH: Glutathione)

Total and reduced amino thiols (CYS: cysteine; CYSGLY: cysteinylglycine; and GSH: glutathione) were measured in erythrocytes (for GSH) and plasma (for CYS and CYSGLY), according to previously validated methods [53,54], at room temperature by an isocratic HPLC analysis on a Discovery C-18 column (250 × 4.6 mm I.D, Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), eluted with a solution of a 0.1 M acetate buffer, pH 4.0 methanol, 81:19 (v/v), at a flow rate of 1 mL/min. Fluorescence intensities were measured with an excitation wavelength at 390 nm and an emission wavelength at 510 nm, using a fluorescence spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan). A standard calibration curve was used for the assayed samples.

### 4.3. Urine Sample Analysis

#### 4.3.1. Nitric Oxide Metabolites (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>)

NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>) concentrations were determined in urine via a colorimetric method based on the Griess reaction, using a commercial kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), as previously described [55]. Samples were spectrophotometrically read at 545 nm.

#### 4.3.2. 8-Isoprostane (8-Iso-PGF<sub>2</sub>α)

Levels of 8-iso-PGF<sub>2</sub>α were measured using an immunoassay EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) in urine. This is a biomarker for lipid peroxidation damage assessment. Samples and standards were spectrophotometrically read at 412 nm. Results were normalized by urine creatinine values.

#### 4.3.3. Interleukin-6

IL-6 levels were determined using the ELISA assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) based on the double-antibody “sandwich” technique, in accordance with the manufacturer’s instructions.

All the above samples and standards were read by a microplate reader spectrophotometer (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The determinations were assessed in duplicate, and the inter-assay coefficient of variation was in the range indicated by the manufacturer.

#### 4.3.4. Creatinine and Neopterin Concentrations

Urinary creatinine and neopterin concentrations were measured by the high-pressure liquid chromatography (HPLC) method, as previously described [45], by the Varian instrument (pump 240, autosampler ProStar 410, SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canada) coupled to a UV-VIS detector (Shimadzu SPD 10-AV, λ = 240 nm, SpectraLab Scientific Inc. for creatinine; and JASCO FP-1520, λ<sub>ex</sub> = 355 nm and at λ<sub>em</sub> = 450 nm, SpectraLab Scientific Inc. for neopterin).

After urine centrifugation at 1500 × g at 4 °C for 5 min, analytic separations were performed at 50 °C on a 5 μm Discovery C-18 analytical column (250 × 4.6 mm I.D., Supelco, Sigma-Aldrich, Merck Life Science S.r.l., Milano, Italy) at a flow rate of 0.9 mL/min. The calibration curves were linear over the range of 0.125–1 μmol/L and 1.25–10 mmol/L for the neopterin and creatinine levels, respectively. The inter-assay and intra-assay coefficients of variation were <5%.

### 4.4. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 10 for Mac (La Jolla, CA, USA). Data are given as a percentage of pre-exposure values. Taking the baseline measures

as 100%, the percentage or fold changes were calculated for each measurement time, allowing an appreciation of the magnitude of change rather than the absolute values. The difference between the percentage of pre-exposure values and 100% was compared by a two-tailed one-sample *t*-test when normality of the sample was reached, as assessed by the *d'*Agostino and Pearson tests. Otherwise, the non-parametric Wilcoxon Rank Sum test was used. Comparisons between the 1.4 ATA and 2.5 ATA groups were performed using the unpaired *t*-test (parametric) or Mann–Whitney (non-parametric). In parallel, to assess differences in the baseline values between conditions, a two-way ANOVA was performed with oxygen pressure (1.4 ATA and 2.5 ATA) and time after exposure. When sphericity was not assumed, analysis of variance (ANOVA) main effects and interactions were interpreted with the Greenhouse–Geisser correction. Sidak-corrected multiple comparisons were used to analyze significant interactions and main effects. The alpha level was set at 0.05. Data are presented as mean (M) ± standard deviation (SD). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

The sample size required for a repeated measures analysis of variance was calculated using the G\*power calculator 3.1.9.7 software (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany) (effect size = 0.65, alpha error = 0.05, Power = 0.80), and the requisite number of participants for this study was 6 in each group, which parallels previous studies [17].

## 5. Conclusions

A short term (60 min) period of mild (1.4 ATA) and high (2.5 ATA) hyperbaric hyperoxia leads to a similar significant increase in the production of reactive oxygen species (ROS), peaking 2 h after exposure and slowly recovering after 48 h, without yet reaching pre-exposure levels at that time.

Similar physiological reactions seem to be present for both very different oxygen doses (1.4 and 2.5 ATA) concerning antioxidant coping strategies. Immunomodulation and inflammatory responses, on the contrary, respond proportionally to the hyperbaric oxygen dose.

Overall, this study provides insights into the cellular effects of a single exposure of hyperbaric hyperoxia, which may either be similar for both doses studied or dose-dependent (such as the immune system response). A further study of the dynamics and kinetics of these effects may lead to new insights as to the optimal dose and administration schedule (inter-dose recovery time) to optimize the therapeutic benefits of intermittent oxygen therapy (either hyperbaric or normobaric). In fact, a more detailed understanding of these effects is paramount to advancing the clinical use of this promising treatment modality.

**Author Contributions:** Conceptualization: C.B., P.L., P.G., C.L., S.T., K.L., M.L., S.M.S., A.V., G.B. and F.G.; investigation: P.L., C.L., M.L., S.T., C.B., K.L., P.G., S.M.S., A.V. and G.B.; writing: C.L., S.T., C.B., P.G., P.L., S.M.S. and F.G.; funding: C.B., F.G., K.L., S.T. and G.B.; data analysis: C.L., S.M.S., A.V., C.B., S.T., K.L., M.L., P.L., F.G., P.G. and G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This manuscript is part of the DELTO<sub>2</sub>X Project that is funded by WBE (Wallonia-Brussels-Education) Belgium for the Environmental, Occupational, Aging (Integrative) Physiology Laboratory, Haute Ecole Bruxelles-Brabant (HE2B), Belgium. The sponsors had no role in the design and conduct of this study; the collection, management, analysis, and interpretation of the data; the preparation, review, or approval of this manuscript; and the decision to submit this manuscript for publication.

**Institutional Review Board Statement:** Ethics Committee approval was obtained from the Bio-Ethical Committee for Research and Higher Education, Brussels (N° B 200-2020-088).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

**Data Availability Statement:** Data are available upon request from the authors.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to all the volunteer participants, especially to the students of the Haute Ecole Bruxelles-Brabant (Belgium), Motor Sciences Department (Physiotherapy).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### Abbreviations

8-iso-PGF2a	8-isoprostane
ATA	Atmosphere absolute
CAT	Catalase
CYSGLY	Cysteinylglycine
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FiO <sub>2</sub>	Inspired Fraction of Oxygen
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
HBOT	Hyperbaric oxygen therapy
IL-6	Interleukine-6
NO	Nitric oxide
NOx	Nitric oxide metabolites
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2 Related—Factor 2
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide dismutase

### References

- Lee, J.S.; Cha, Y.S.; Lim, J. Association between number of hyperbaric oxygen therapy sessions and neurocognitive outcomes of acute carbon monoxide poisoning. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1127978. [[CrossRef](#)]
- Biggs, A.T.; Littlejohn, L.F.; Dainer, H.M. Alternative Uses of Hyperbaric Oxygen Therapy in Military Medicine: Current Positions and Future Directions. *Mil. Med.* **2022**, *187*, e40–e46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harch, P.G. Systematic Review and Dosage Analysis: Hyperbaric Oxygen Therapy Efficacy in Mild Traumatic Brain Injury Persistent Postconcussion Syndrome. *Front. Neurol.* **2022**, *13*, 815056. [[CrossRef](#)]
- MacLaughlin, K.J.; Barton, G.P.; Braun, R.K.; MacLaughlin, J.E.; Lamers, J.J.; Marcou, M.D.; Eldridge, M.W. Hyperbaric air mobilizes stem cells in humans; a new perspective on the hormetic dose curve. *Front. Neurol.* **2023**, *14*, 1192793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Perdrizet, G.A. Principles and practice of hyperbaric medicine: A medical practitioner’s primer, part I. *Conn. Med.* **2014**, *78*, 325–332. [[PubMed](#)]
- de Wolde, S.D.; Hulskes, R.H.; de Jonge, S.W.; Hollmann, M.W.; van Hulst, R.A.; Weenink, R.P.; Kox, M. The Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Markers of Oxidative Stress and the Immune Response in Healthy Volunteers. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 826163. [[CrossRef](#)]
- Balestra, C.; Arya, A.K.; Leveque, C.; Virgili, F.; Germonpre, P.; Lambrechts, K.; Lafere, P.; Thom, S.R. Varying Oxygen Partial Pressure Elicits Blood-Borne Microparticles Expressing Different Cell-Specific Proteins—Toward a Targeted Use of Oxygen? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7888. [[CrossRef](#)]
- Fratantonio, D.; Virgili, F.; Zucchi, A.; Lambrechts, K.; Latronico, T.; Lafere, P.; Germonpre, P.; Balestra, C. Increasing Oxygen Partial Pressures Induce a Distinct Transcriptional Response in Human PBMC: A Pilot Study on the “Normobaric Oxygen Paradox”. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 458. [[CrossRef](#)]
- De Bels, D.; Tillmans, F.; Corazza, F.; Bizzari, M.; Germonpre, P.; Radermacher, P.; Orman, K.G.; Balestra, C. Hyperoxia Alters Ultrastructure and Induces Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Biomolecules* **2020**, *10*, 282. [[CrossRef](#)]
- Cimino, F.; Balestra, C.; Germonpre, P.; De Bels, D.; Tillmans, F.; Saija, A.; Speciale, A.; Virgili, F. Pulsed high oxygen induces a hypoxic-like response in Human Umbilical Endothelial Cells (HUVECs) and in humans. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *113*, 1684–1689. [[CrossRef](#)]
- Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Marzorati, M.; Porcelli, S.; Bosco, G.; Balestra, C.; Montorsi, M.; Lafortuna, C.; Vezzoli, A. The “ON-OFF” Switching Response of Reactive Oxygen Species in Acute Normobaric Hypoxia: Preliminary Outcome. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4012. [[CrossRef](#)]
- Leveque, C.; Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpre, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Gussoni, M.; Levenez, M.; Lafere, P.; Guerrero, F.; et al. Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different Levels (10% or 15%) of Normobaric Hypoxia Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Balestra, C.; Lambrechts, K.; Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Levenez, M.; Germonpre, P.; Virgili, F.; Bosco, G.; Lafere, P. Hypoxic and Hyperoxic Breathing as a Complement to Low-Intensity Physical Exercise Programs: A Proof-of-Principle Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Theunissen, S.; Balestra, C.; Bolognesi, S.; Borgers, G.; Vissenaeken, D.; Obeid, G.; Germonpre, P.; Honore, P.M.; De Bels, D. Effects of Acute Hypobaric Hypoxia Exposure on Cardiovascular Function in Unacclimatized Healthy Subjects: A “Rapid Ascent” Hypobaric Chamber Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 5394. [[CrossRef](#)]
- Arya, A.K.; Balestra, C.; Bhopale, V.M.; Tuominen, L.J.; Raisanen-Sokolowski, A.; Dugrenot, E.; L’Her, E.; Bhat, A.R.; Thom, S.R. Elevations of Extracellular Vesicles and Inflammatory Biomarkers in Closed Circuit SCUBA Divers. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5969. [[CrossRef](#)]

16. Salvagno, M.; Coppalini, G.; Taccone, F.S.; Strapazzon, G.; Mrakic-Sposta, S.; Rocco, M.; Khalife, M.; Balestra, C. The Normobaric Oxygen Paradox-Hyperoxic Hypoxic Paradox: A Novel Expedient Strategy in Hematopoiesis Clinical Issues. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24*, 82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Leveque, C.; Mrakic-Sposta, S.; Lafere, P.; Vezzoli, A.; Germonpre, P.; Beer, A.; Mievis, S.; Virgili, F.; Lambrechts, K.; Theunissen, S.; et al. Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24*, 664. [[CrossRef](#)]
18. Louge, P.; Pignel, R.; Serratrice, J.; Stirnemann, J. Validation of sham treatment in hyperbaric medicine: A randomised trial. *Diving Hyperb. Med.* **2023**, *53*, 51–54. [[CrossRef](#)]
19. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not “Only” a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. [[CrossRef](#)]
20. Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *908*, 244–254. [[CrossRef](#)]
21. Franceschi, C.; Campisi, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69* (Suppl. S1), S4–S9. [[CrossRef](#)]
22. Akhigbe, R.; Ajayi, A. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: A review. *Lipids Health Dis.* **2021**, *20*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Checa, J.; Aran, J.M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J. Inflamm. Res.* **2020**, *13*, 1057–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Maroon, J.C. The effect of hyperbaric oxygen therapy on cognition, performance, proteomics, and telomere length—The difference between zero and one: A case report. *Front. Neurol.* **2022**, *13*, 949536. [[CrossRef](#)]
25. Zhilyaev, S.Y.; Moskvin, A.N.; Platonova, T.F.; Gutsaeva, D.R.; Churilina, I.V.; Demchenko, I.T. Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci. Behav. Physiol.* **2003**, *33*, 783–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schildknecht, S.; Ullrich, V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *484*, 183–189. [[CrossRef](#)]
27. Muskat, J.C.; Babbs, C.F.; Goergen, C.J.; Rayz, V.L. Transport of nitrite from large arteries modulates regional blood flow during stress and exercise. *Front. Cardiovasc. Med.* **2023**, *10*, 1146717. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Schottlender, N.; Gottfried, I.; Ashery, U. Hyperbaric Oxygen Treatment: Effects on Mitochondrial Function and Oxidative Stress. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1827. [[CrossRef](#)]
29. Eventoff, W.; Tanaka, N.; Rossmann, M.G. Crystalline bovine liver catalase. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 799–801. [[CrossRef](#)]
30. Fita, I.; Silva, A.; Murthy, M.; Rossmann, M. The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* **1986**, *42*, 497–515. [[CrossRef](#)]
31. Benedetti, S.; Lamorgese, A.; Piersantelli, M.; Pagliarani, S.; Benvenuti, F.; Canestrari, F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 312–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Eken, A.; Aydin, A.; Sayal, A.; Ustündağ, A.; Duydu, Y.; Dündar, K. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 1133–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ballinger, C.A.; Mendis-Handagama, C.; Kalmar, J.R.; Arnold, R.R.; Kinkade, J.M., Jr. Changes in the localization of catalase during differentiation of neutrophilic granulocytes. *Blood* **1994**, *83*, 2654–2668. [[CrossRef](#)]
34. Sureda, A.; Ferrer, M.D.; Tauler, P.; Maestre, I.; Aguiló, A.; Córdova, A.; Tur, J.A.; Roche, E.; Pons, A. Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion. *Free Radic. Res.* **2007**, *41*, 874–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liu, T.; Sun, L.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zheng, J. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2022**, *36*, e22942. [[CrossRef](#)]
36. Han, G.; Liu, K.; Li, L.; Li, X.; Zhao, P. The effects of hyperbaric oxygen therapy on neuropathic pain via mitophagy in microglia. *Mol. Pain* **2017**, *13*, 1744806917710862. [[CrossRef](#)]
37. Gao, W.; Guo, L.; Yang, Y.; Wang, Y.; Xia, S.; Gong, H.; Zhang, B.K.; Yan, M. Dissecting the Crosstalk between Nrf2 and NF-κB Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 809952. [[CrossRef](#)]
38. Bartscher, J.; Mallet, R.T.; Pialoux, V.; Millet, G.P.; Bartscher, M. Adaptive Responses to Hypoxia and/or Hyperoxia in Humans. *Antioxid. Redox Signal.* **2022**, *37*, 887–912. [[CrossRef](#)]
39. Michalak, L.; Bulska, M.; Strzabala, K.; Szcześniak, P. Neopterin as a marker of cellular immunological response. *Adv. Hyg. Exp. Med.* **2017**, *71*, 727–736. [[CrossRef](#)]
40. Huber, C.; Fuchs, D.; Hausen, A.; Margreiter, R.; Reibnegger, G.; Spielberger, M.; Wachter, H. Pteridines as a new marker to detect human T cells activated by allogeneic or modified self major histocompatibility complex (MHC) determinants. *J. Immunol.* **1983**, *130*, 1047–1050. [[CrossRef](#)]
41. Huber, C.; Batchelor, J.R.; Fuchs, D.; Hausen, A.; Lang, A.; Niederwieser, D.; Reibnegger, G.; Swetly, P.; Troppmair, J.; Wachter, H. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J. Exp. Med.* **1984**, *160*, 310–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ghisoni, K.; Martins Rde, P.; Barbeito, L.; Latini, A. Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. *J. Psychiatr. Res.* **2015**, *71*, 134–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Gottfried, I.; Schottlender, N.; Ashery, U. Hyperbaric Oxygen Treatment-From Mechanisms to Cognitive Improvement. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. World Medical, A. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [[CrossRef](#)]
45. Bosco, G.; Paganini, M.; Giacon, T.A.; Oppio, A.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Moro, T.; Paoli, A.; Zanotti, F.; Zavan, B.; et al. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9755. [[CrossRef](#)]
46. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; D'Alessandro, F.; Paganini, M.; Dellanoce, C.; Cialoni, D.; Bosco, G. Change in Oxidative Stress Biomarkers During 30 Days in Saturation Dive: A Pilot Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 7118. [[CrossRef](#)]
47. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; et al. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2018**, *9*, 157. [[CrossRef](#)]
48. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Rizzato, A.; Della Noce, C.; Malacrida, S.; Montorsi, M.; Paganini, M.; Cancellara, P.; Bosco, G. Oxidative stress assessment in breath-hold diving. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 2449–2456. [[CrossRef](#)]
49. Bosco, G.; Rizzato, A.; Quartesan, S.; Camporesi, E.; Mrakic-Sposta, S.; Moretti, S.; Balestra, C.; Rubini, A. Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water. *Undersea Hyperb. Med.* **2018**, *45*, 191–198. [[CrossRef](#)]
50. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A. A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 306179. [[CrossRef](#)]
51. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Vezzoli, A. Comment on Menzel et al. Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice—Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants* **2021**, *10*, 414. *Antioxidants* **2021**, *10*, 836. [[CrossRef](#)]
52. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A. Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2012**, *2012*, 973927. [[CrossRef](#)]
53. Dellanoce, C.; Cozzi, L.; Zuddas, S.; Pratali, L.; Accinni, R. Determination of different forms of aminothiols in red blood cells without washing erythrocytes. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 327–331. [[CrossRef](#)]
54. Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Mrakic-Sposta, S.; Montorsi, M.; Moretti, S.; Tonini, A.; Pratali, L.; Accinni, R. Oxidative Stress Assessment in Response to Ultraendurance Exercise: Thiols Redox Status and ROS Production according to Duration of a Competitive Race. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 6439037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ciccone, M.M.; Bilianou, E.; Balbarini, A.; Gesualdo, M.; Ghiadoni, L.; Metra, M.; Palmiero, P.; Pedrinelli, R.; Salvetti, M.; Scicchitano, P.; et al. Task force on: 'Early markers of atherosclerosis: Influence of age and sex'. *J. Cardiovasc. Med.* **2013**, *14*, 757–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



# Discussion générale

L'hormèse chez les mammifères est définie comme une capacité d'adaptation à différents stress et englobe des processus dynamiques de réparation, de récupération et de toxicité qui se produisent sur une durée définie [44]. Au niveau le plus élémentaire, ce mécanisme est médié par des combinaisons « dose-réponse » et « dose-temps », au stress oxydant, aux changements métaboliques et à l'inflammation [235]. Il s'agit d'un processus bien connu en situation pathologique ou de vieillissement [236]. En effet, l'équilibre lié à l'âge entre facteurs pro- et anti-inflammatoires est une étiologie reconnue de maladies métaboliques, cardiovasculaires ou neurodégénératives [237].

Jusqu'à il y a dix ans, nous pensions que les radicaux libres d'oxygènes (ROS) provoquaient des effets exclusivement toxiques, associées à diverses pathologies [238]. Au fil du temps, le concept a évolué pour soutenir l'idée selon laquelle la présence de ROS dans les cellules permettrait des fonctions bénéfiques spécifiques [239]. Il apparaît que la spécificité biologique de l'action des ROS passe par la quantité, la durée et la localisation de la production de ceux-ci, ce que nous avons pu souligner dans ce travail.

De plus, des données récentes plaident en faveur de l'étude d'un nouveau paradigme qui consiste à traiter l'oxygène comme un puissant stimulus des réactions du réseau moléculaire plutôt que comme un simple médicament [199]. Plusieurs études explorant l'effet de l'hyperoxie aiguë ont démontré qu'il était possible de stimuler la production du facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ) qui était censé s'exprimer uniquement dans des conditions hypoxiques, d'où son nom. Ce phénomène est appelé « Normobaric Oxygen Paradox » [70, 73, 204].

Lors de ces interventions, le retour à la normoxie après une hyperoxie légère (30% FiO<sub>2</sub>) est ressenti comme un stress hypoxique sans activation significative du NF- $\kappa$ B [71]. À l'inverse, une hyperoxie élevée (100% FiO<sub>2</sub>) et très élevée (140% FiO<sub>2</sub>), induisent une réponse simultanée du stress oxydant et inflammatoire, caractérisé par l'activation respective de NRF2 et de NF- $\kappa$ B au cours des 24 premières heures suivant l'exposition. Ces observations suggèrent une réponse cellulaire modulée par une exposition ciblée à l'oxygène [71]. Ceci est en outre confirmé par l'expression de microparticules (MP) sous différentes pressions partielles d'oxygène. En effet, toutes les expositions testées ont démontré des élévations significatives de CD41, CD66b, TMEM, de l'expression et de la liaison à la phalloïdine. Cependant, pour 1,4 ATA (140% FiO<sub>2</sub>), la réponse est totalement opposée aux autres expositions avec des diminutions significatives de tous les paramètres mesurés [220].

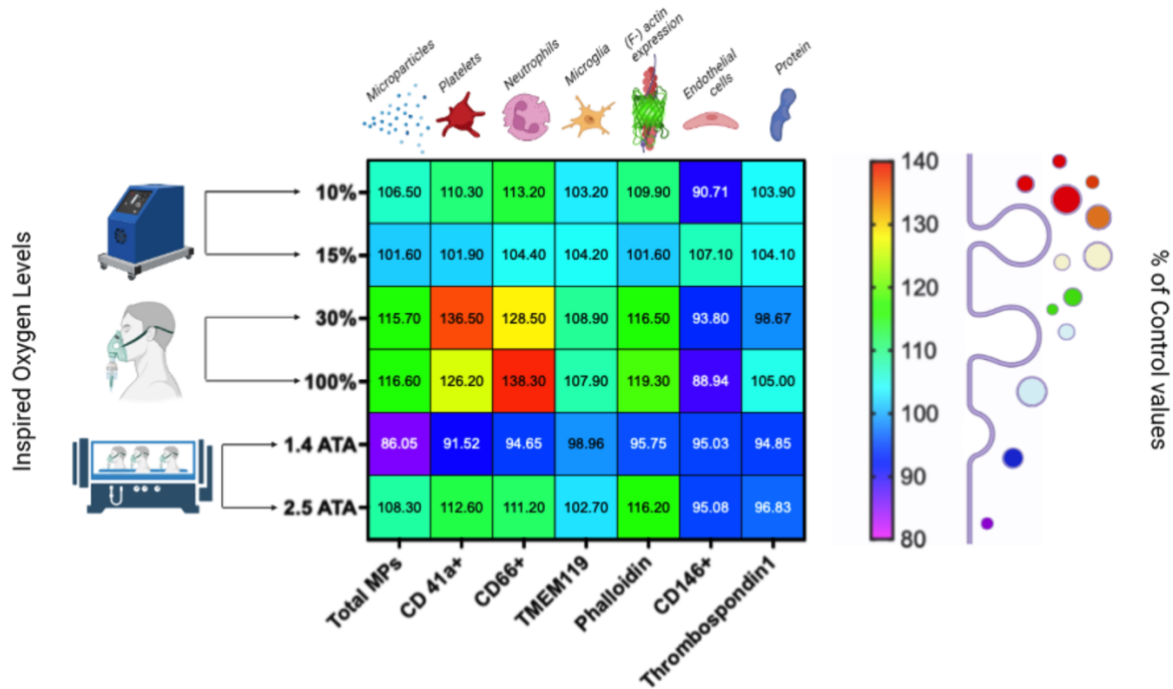


Figure 18 : Variations en pourcentage des MP (Monocytes/Macrophages) après 60 minutes de respiration à l'oxygène.

Les niveaux d'oxygène inspirés sont indiqués sur l'axe des ordonnées, et les MPs totales ainsi que les sous-types de MPs sont présentés en abscisse. Le prélèvement sanguin a eu lieu 120 minutes après les expositions (au total, 48 sujets ont participé à l'expérience). Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post / pré \*100).

## Effet du stimulus hypoxique

Comme le montrent nos études, l'exposition à une pression partielle d'oxygène modulé, après 60min d'exposition, a induit un stimulus, provoquant une production accrue de ROS à partir de 30 minutes après l'exposition.

Plus précisément, nous avons observé une augmentation plus rapide et plus importante de la production de ROS à mesure que l'hypoxie augmentait (10% et 15%). Ceci peut être expliqué par l'inhibition par l'hypoxie intermittente du complexe mitochondrial I via l'activation des NOx (NADPH oxydase), augmentant ainsi la production de ROS [240]. Cependant, après 48 heures de récupération, les niveaux de ROS sont revenus proches de la valeur de base. Il a été démontré que les conditions hypoxiques aiguës induisent une fission mitochondriale [241]. Ce mécanisme est particulièrement observé dans les situations d'hypoxie-réoxygénation et est causé par une diminution de la production d'ATP [242]. Cette adaptation semble être une contre-mesure pour maintenir la production mitochondriale de ROS à un niveau équilibré [243]. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de la production de NOx (NO<sup>2-</sup> et NO<sup>3-</sup>), avec un pic après 2 h toujours significatif après 8 h. En raison de sa nature radicalaire, la réaction entre le superoxyde et le NO se déroule de manière limitée par diffusion (avec une constante de vitesse de  $k = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [46] ce qui est plus rapide que la dismutation catalysée par la SOD. L'avantage du piégeage des ions superoxydes est d'éliminer les électrons radicalaires à un stade précoce, stoppant ainsi les futures réactions radicalaires en chaîne [244]. En effet, nos résultats suggèrent que le pic de Nox à 2h survenant après le pic de ROS (30 min) indique une activité précoce du NO en tant que piègeur de ROS.

Ceci est en outre confirmé par le maintien des NOx au cours de l'hypoxie normobare. Les résultats sont cohérents avec les précédents[245], selon lesquels l'activité du GPX et de la SOD n'était pas significativement augmentée après une hypoxie normobare [246]. Compte tenu de la production abondante de NO, la capacité du NO à éliminer le superoxyde semble comparable à l'activité de la SOD intracellulaire et pourrait même être plus efficace. Cependant, le peroxy-nitrites (ONOO<sup>-</sup>) résultant de cette réaction est un oxydant puissant et est toxique pour les cellules lorsqu'il est produit en excès au-delà de la capacité antioxydante[247]. Mais, actuellement, de nouvelles preuves suggèrent une action bénéfique d'ONOO<sup>-</sup>. Dans le système vasculaire, par exemple, des niveaux modérés d'ONOO<sup>-</sup> semblent stimuler la synthèse des prostaglandines et jouer un rôle dans les réactions de transduction du signal cellulaire[248]. De plus, dans des conditions inflammatoires, la production simultanée de NO et de ONOO<sup>-</sup> suggère que la détoxification du superoxyde par le NO dépasse l'action cytotoxique de ONOO<sup>-</sup> [249].

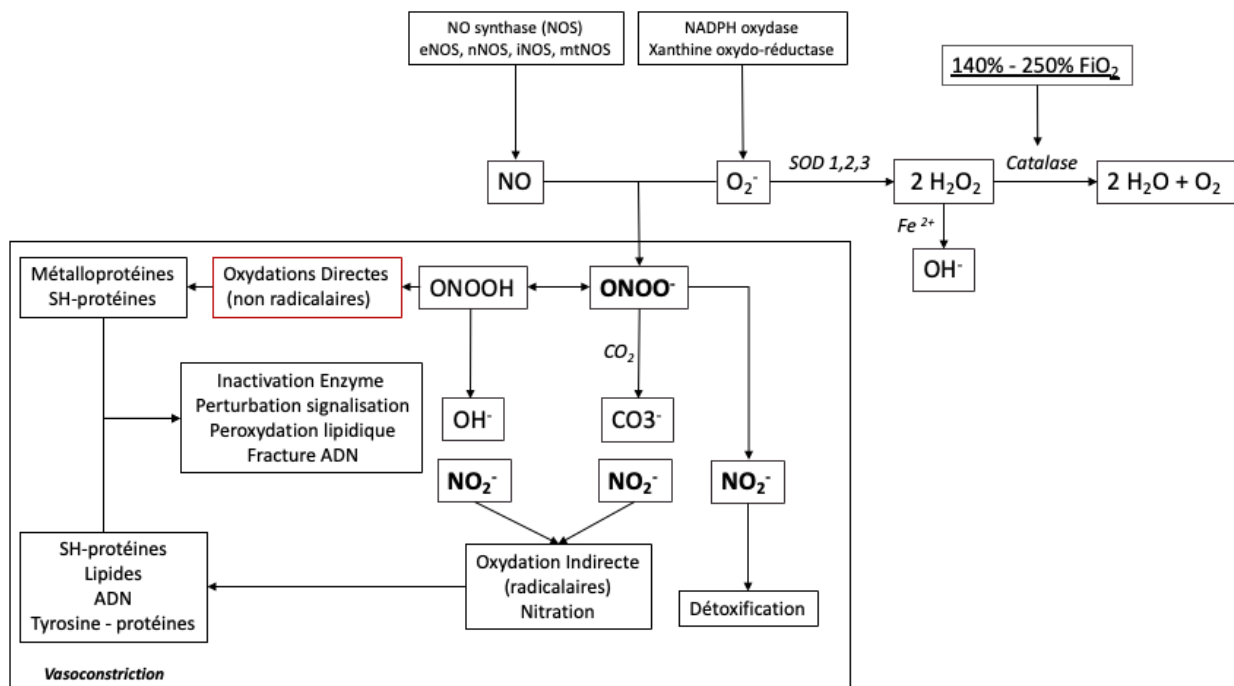
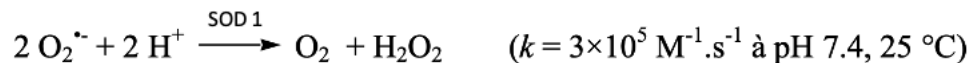


Figure 19 Chimie biologique du peroxy-nitrite (adapté de Lucas Liaudet)

Individuellement, les radicaux O<sub>2</sub><sup>-</sup> et NO sont modérément toxiques, mais leur proximité entraîne immédiatement la formation d'un oxydant puissant, le peroxy-nitrite ou ONOO<sup>-</sup>, non radicalaire. Cette réaction dépend de la capacité de diffusion de NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup>, générant ONOO<sup>-</sup> chaque fois qu'ils se rencontrent. Dans des conditions telles que l'inflammation ou l'ischémie-reperfusion, où la formation de NO et O<sub>2</sub><sup>-</sup> est augmentée simultanément, des concentrations de ONOO<sup>-</sup> allant jusqu'à 50-100 μM par minute peuvent être produites, avec une demi-vie de 10-20 ms et une capacité de diffusion sur des distances de 5-20 μm. L'homéostasie redox est maintenue par divers antioxydants, notamment la SOD, convertissant O<sub>2</sub><sup>-</sup> en peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et la catalase, transformant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, non radicalaire, peut être converti en radical hydroxyl, OH<sup>•</sup>, plus réactif, en présence de métaux (réaction de Fenton). D'autres antioxydants tels que le glutathion (GSH), l'ascorbate (vitamine C) et l'α-tocophérol (vitamine E) agissent comme pièges à radicaux. La détoxification de ONOO<sup>-</sup> implique des molécules contenant du sélénium, telles que la glutathion peroxydase, la sélénoprotéine P, la sélénométhionine et la sélénocystéine. Le stress oxydatif ou nitrosatif survient lorsque ces systèmes sont dépassés par une production excessive de radicaux oxygénés ou d'azote.

Dans diverses situations, les électrons s'échappant des réactions enzymatiques et non enzymatiques déclenchent la production de ROS, représentés par l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'hydroxyde ( $HO^{\bullet}$ )[244]. En solution aqueuse,  $O_2^{\bullet-}$  a une demi-vie d'environ 4  $\mu$ sec, ce qui lui confère la capacité de se diffuser sur une distance allant de 150 à 220 nm soit l'équivalent d'environ 11 cellules animales[250, 251]. Cependant, cette distance est insuffisante pour que l' $O_2^{\bullet-}$  produit de manière extracellulaire puisse se déplacer à l'intérieur d'une large quantité de cellules. De plus, l' $O_2^{\bullet-}$  généré à l'intérieur de la cellule est très instable ce qui lui favorise une dismutation spontanée très rapide selon la réaction suivante [252] :



Ce mécanisme permet de transformer l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  permettant de limiter les dommages cellulaires au profit d'un processus adaptatif.

Bien que  $H_2O_2$  n'ait pas été directement mesuré, nous émettons l'hypothèse que l'augmentation des NOx, en particulier du  $NO_2$ , pourrait refléter l'apparition d'une activité adaptative par angiogénèse[253].

Ces données confirment les résultats des études précédentes en mettant en évidence une augmentation significative de la production de ROS [233, 245, 254, 255] pendant une courte période d'hypoxie modérée ou extrême.

## Effet du stimulus hyperoxique

Par ailleurs, nos résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différence dans l'intensité de la réponse initiale entre les deux groupes (30% et 100 %). Cependant, après l'apogée, qui est atteinte 8 heures après l'exposition, la cinétique commence à diverger avec une différence statistique entre les groupes à 48 heures. Ce décalage dans la cinétique des ROS peut être expliqué par le phénomène suivant. L'acide urique, que nous avons mesuré dans le plasma sanguin, est un antioxydant aqueux majeur chez l'homme, en particulier pour les peroxy-nitrites ( $ONOO^-$ ) dans le milieu hydrophile. Cependant, l'acide urique devient un puissant pro-oxydant dans des conditions hydrophobes. Il peut induire un stress oxydant intracellulaire et mitochondrial et stimuler l'expression de cytokines inflammatoires [256], ce que nous mettons en évidence par la réaction biphasique de l'IL-6. Enfin, bien que non significatif, le profil de créatinine est cohérent avec les autres résultats de cette étude, notamment les ROS et l'acide urique. En effet, la créatine kinase est inhibée par les ROS, notamment  $H_2O_2$  [31], tandis que l'acide urique agit comme un chélateur du fer dans les fluides extracellulaires, celui-ci est un cofacteur de l'activité de la créatine kinase [30]. De toute évidence, les urates peuvent être liés à la génération de ROS (en particulier dans des conditions de stress oxydatif), par exemple lors de leur interaction avec le peroxy-nitrite, entraînant la formation de produits actifs mais moins réactifs [256]. Nous pouvons ainsi supposer que l'augmentation observée du taux de ROS dans le plasma après une hyperoxie modérée ( $FiO_2$  de 30 %) n'est pas associée à l'élévation du stress oxydatif mais au mécanisme de protection mobilisé par l'organisme lors de la neutralisation du peroxy-nitrite hautement réactif avec l'acide urique [257].

En fait, un avantage évolutif de l'acide urique a été proposé en démontrant sa forte capacité à éliminer les radicaux libres, ce qui fait de lui un excellent piègeur d'oxydant [258]. Des études ont montré que l'UA contribue jusqu'à 60 % à l'élimination des radicaux libres dans le sérum humain [259]. De plus, l'administration systémique d'acide urique a été associée à une augmentation de la capacité antioxydante du plasma, tant au repos qu'après l'exercice, chez des sujets sains [260, 261].

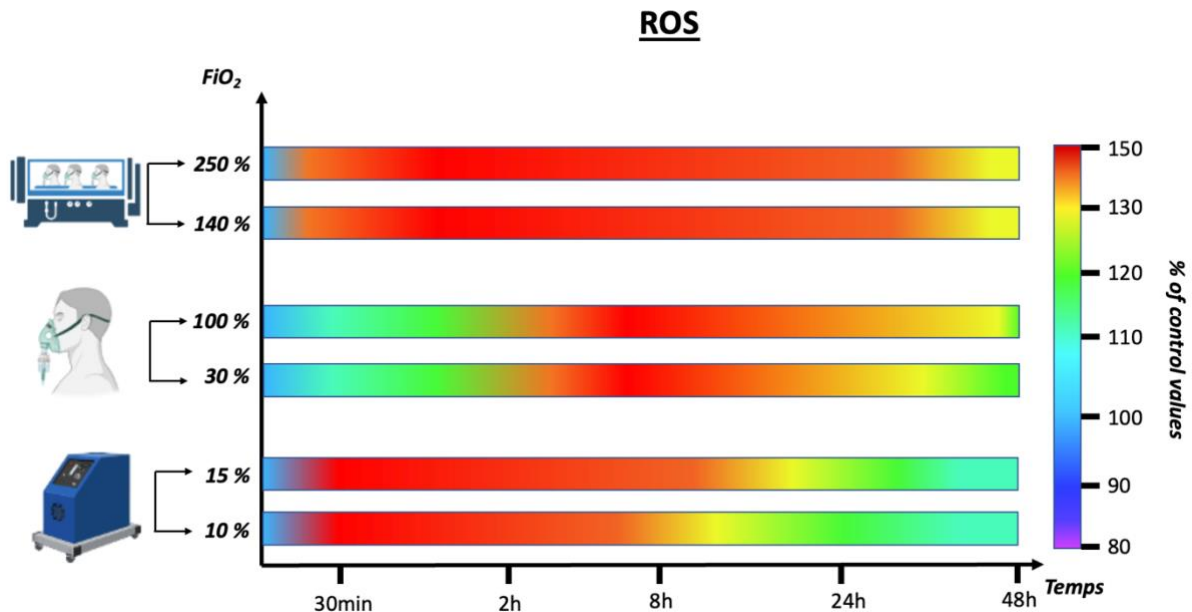


Figure 20 : Cinétique de l'expression des ROS en fonction de la FiO<sub>2</sub> :

Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post /pré \*100)

Un autre fait très intéressant en hyperbarie, est l'observation d'une cinétique similaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) plasmatiques à 1,4 ATA (140 kPa) et à 2,5 ATA (250 kPa). Le pic de production est atteint vers 2h et reste au-dessus du niveau de base pendant 48h. Cette évolution similaire des ROS entre les deux expositions est une observation intrigante, qui suggère que malgré la dose d'oxygène très différente, des taux comparables de production de ROS se produisent. Cependant, nos résultats contredisent une étude récente qui a évalué l'effet de l'OHB sur les marqueurs oxydatifs et la réponse immunitaire [262]. En effet, dans cette étude, aucune modification significative des ROS plasmatiques n'a été constatée suite à une seule séance d'OHB de 75 min de respiration à 100 % d'oxygène à travers un masque facial bien ajusté à une pression de 240 kPa (2,4 ATA) avec deux pauses respiratoires d'air de 5 min (respiration d'air normal) et une réduction de pression de 10 minutes. Notre protocole impliquait une exposition de 60 minutes à 1,4 ATA et 2,5 ATA avec 100 % d'oxygène sans aucune « coupure d'air ». Bien que légèrement différent, notre protocole démontre une augmentation significative de la production de ROS déjà 30 minutes après la fin de l'exposition. Il est donc possible que les « air-breaks » effectués (deux fois pendant 5 min) soient suffisants pour réduire drastiquement le stress oxydant. Mais des recherches supplémentaires avec une configuration expérimentale différente seraient nécessaires pour évaluer cette hypothèse [263]. Parallèlement, nous avons observé une augmentation des taux de créatinine ; ceux-ci pouvant être dus à la vasoconstriction des artérioles afférentes rénales provoquée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette constriction est plus prononcée pour l'exposition à l'oxygène la plus élevée (2,5 ATA).

Le pic d'augmentation de la créatinine se produit lorsque les métabolites de l'oxyde nitrique (NOx) sont à leur niveau le plus bas (dans les deux expositions). Cela suggère que lors d'une exposition hyperoxique, la vasoconstriction induite réduit l'afflux sanguin des reins ou d'autres organes. Cette diminution du flux sanguin réduit la contrainte de cisaillement et, par conséquent, la production de monoxyde d'azote (NO). Parallèlement, la biodisponibilité du NO est réduite par la présence de ROS qui exercent une action de piégeage, étant donné qu'il n'existe pas de mécanismes enzymatiques d'inactivation du NO, tandis que sa vie biologique après synthèse dans les vaisseaux dépend de réactions avec l'hémoglobine dans le sang, les tissus, les thiols, l'oxygène moléculaire et l'anion superoxyde. Dans des conditions d'hyperoxie extrême, lorsqu'il y a une forte augmentation de la production d'anions superoxydes, le NO existant peut être neutralisé par les  $O_2^{\bullet-}$ , conduisant à une diminution de la biodisponibilité tissulaire, affaiblissant son action vasorelaxante basale, et donc la vasoconstriction. La vérification de cette hypothèse a été abordée il y a quelques années par l'équipe de Demchenko en analysant les modifications du flux sanguin cérébral en réponse à des modifications de l'équilibre entre NO et  $O_2^{\bullet-}$  dans le cerveau durant une oxygénation hyperbare, avec l'administration intraveineuse de superoxyde dismutase et d'une inhibition de NO synthase. L'effet vasodilatateur de la superoxyde dismutase dans l'oxygénation hyperbare n'a pas été observé chez les animaux ayant reçu des doses de l'inhibiteur de la NO synthase préalablement à l'exposition [264]. Ces résultats prouvent qu'un mécanisme de vasoconstriction hyperoxique dans le cerveau consiste en l'inactivation du NO par les anions superoxydes, diminuant ainsi son action vasorelaxante basale.

En effet, lors de nos séances hyperbares, sans activité physique, seule une vasoconstriction est présente, les contraintes de cisaillement sont réduites et un flux laminaire est favorisé. Dans des conditions d'écoulement laminaire pleinement développées, une grande partie du NO libéré reste concentrée dans les lames fluides proches des parois, dans lesquelles les niveaux de nitrite peuvent s'accumuler jusqu'à atteindre des concentrations vasoactives dans les zones de résistance en aval. Cette synthèse et cette délivrance locales minimisent le gaspillage du NO endogène[248]. La vasodilatation qui en résulte diminue la résistance vasculaire régionale et, à son tour, augmente le flux sanguin régional ainsi que la contrainte de cisaillement des parois dans les branches mères. Ceci crée finalement un effet de rétroaction positif qui provoque une libération artérielle locale supplémentaire de NO[265]. Ce surplus de NO serait ainsi « non circulant » lors de la séance d'OHB, expliquant la réduction de NOx mesurée directement après exposition hyperbare à l'oxygène. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse qu'après la séance hyperbare, le NO localement présent sera libéré en circulation en raison de l'activité physique normale de la vie quotidienne, ce qui pourrait expliquer son augmentation de rebond après 24 h, persistant jusqu'à 48 h. Nos résultats confirment une étude précédente qui n'avait pas trouvé d'augmentation systémique du NO lors d'expositions hyperbares à l'oxygène[5].

## CATALASE

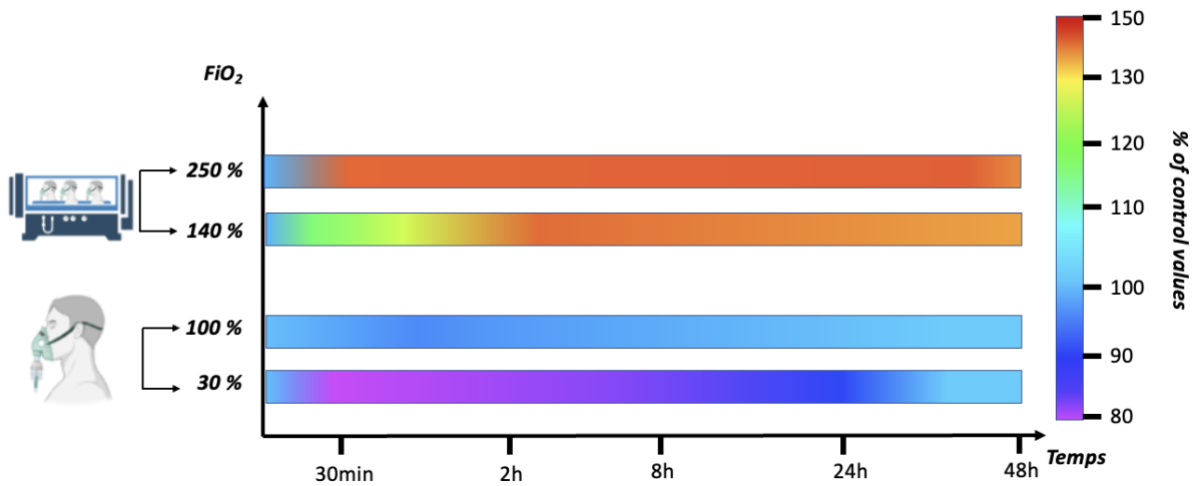


Figure 21 : Cinétique de l'expression de la catalase en fonction de la  $FiO_2$  :

Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post/pré \*100).

Dans un cadre hyperoxique nous notons une différence importante entre les conditions normobares et hyperbares. En effet, en condition d'hyperoxie normobare nous constatons l'absence de réponse antioxydante intracellulaire via la (CAT et SOD), malgré la production de ROS au fil du temps. Cela suggère que la cellule demeure dans un état « d'oxydation permissive ». Cet état oxydatif pourrait être défini comme une tolérance des mécanismes cellulaires à un niveau modéré de molécule pro oxydante par nécessité de second messenger. Alors que dans les conditions d'hyperoxie hyperbare nous observons une augmentation significative de la catalase au-delà de 48h. Cette différence suggère encore l'existence d'un effet seuil dépendant de la quantité d' $H_2O_2$  nécessaire à la stimulation d'une contre mesure antioxydante. En effet, l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) stimule la catalase (CAT) pour initier la dégradation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  [248].

Il convient de noter que la CAT présente l'un des taux de renouvellement les plus élevés parmi les enzymes connues, avec environ 40 000 000 de molécules par seconde [266, 267]. Contrairement aux autres peroxydases, la CAT ne génère pas de radicaux libres. Généralement, la réponse à une augmentation du taux de production de radicaux libres est une augmentation des niveaux d'enzymes antioxydantes. En effet, la CAT montre une activité accrue très rapidement après une exposition d'une heure à HBO.

## SOD

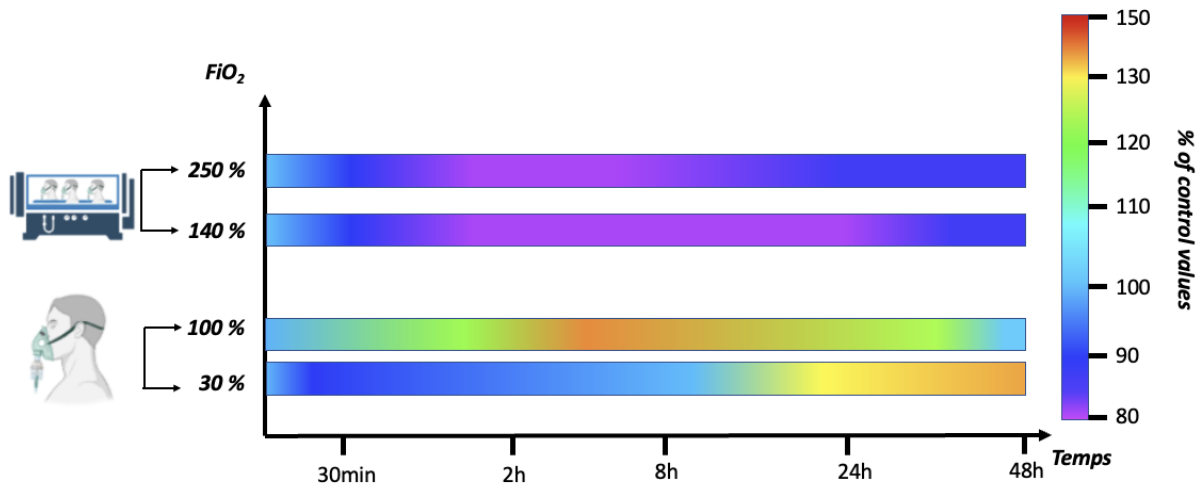
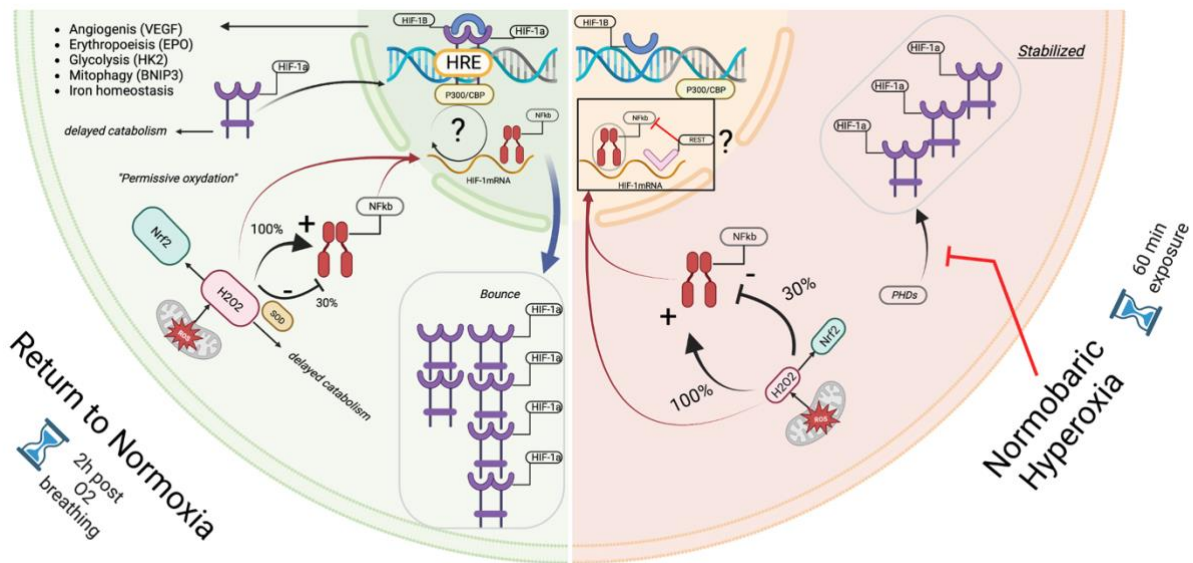


Figure 22 Cinétique de l'expression de la SOD en fonction de la FiO<sub>2</sub>:

Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post/pré \*100).

L'activité de la SOD est apparemment restée inchangée à la fin de la séance HBO et pendant les 48 heures suivantes. De façon intéressante, la littérature rapporte qu'au moment du 15<sup>ème</sup> traitement, une diminution significative des activités SOD et CAT (-20% chacune) a été observée par rapport à la 1<sup>ère</sup> exposition à l'OHB [268]. D'autres auteurs ont trouvé des résultats différents ne montrant aucune variation même après la 20<sup>ème</sup> séance hyperbare [269]. Nous n'avons pas d'explication définitive à cette apparente contradiction, mais il a été proposé que très probablement, l'espèce impliquée dans l'inactivation de la SOD et de la CAT est l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) et qu'après plusieurs séances hyperbares, les réactions protectrices contre cette espèce réactive peuvent varier. Cette réponse au stress comprend l'activation transcriptionnelle de divers gènes codant pour des enzymes antioxydantes et de détoxification dans le but d'atténuer les effets délétères de la production accrue de ROS. En effet, les neutrophiles pourraient libérer des enzymes antioxydantes et particulièrement du CAT dans l'espace extracellulaire afin d'augmenter l'effet antioxydant entourant le neutrophile. Cette sécrétion pourrait être importante pour éviter les dommages oxydatifs dans les tissus induits par la génération des neutrophiles de ROS. Des études antérieures ont montré que la CAT est colocalisée dans des granules spécifiques avec des protéines peroxysomales et lysosomales telles que la myéloperoxydase, les hydrolases et les peroxydases [270]. Sureda et ses collègues [271] ont observé que la présence de CAT dans ces granules, en plus de l'augmentation détectée de l'activité extracellulaire de CAT après l'activation des neutrophiles, est en accord avec l'existence possible d'enzymes antioxydantes libérées par les neutrophiles. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la CAT plasmatique, et cela est encore confirmé par d'autres résultats montrant une activation du système immunitaire avec une augmentation significative de la néoptérine. Il convient de souligner que les calculs ANOVA bidirectionnels pour l'exposition à la pression d'oxygène montrent une différence dans les deux paramètres. Cela semble montrer que les niveaux d'oxygène de 140% et 250% de FiO<sub>2</sub> ont un effet sélectif sur la réponse immunitaire, ce qui aurait pu être confirmé si la différence CAT était significative pour les deux expositions ; mais l'ANOVA bidirectionnelle n'a pas tout à fait atteint un niveau de signification (p = 0,056).





**Figure 23 : Normobaric oxygen paradox (NOP) et réponses cellulaires :**

*Pendant l'hyperoxie intermittente, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans le cytosol est favorisée en inhibant les prolyl hydroxylases (PHDs) et la FIH, tandis que la synthèse nucléaire est bloquée par l'inhibition de protéines comme REST. Cela entraîne un début plus précoce de l'activation immunitaire par rapport aux mécanismes de défense antioxydants, créant une cinétique délicate entre l'inflammation et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), agissant comme des "seconds messagers". Au retour à la normoxie, la déstabilisation de HIF-1 $\alpha$  est retardée en raison d'une protection antioxydante tardive, induisant un état de "permissive oxydation". En conséquence, la synthèse nucléaire débute plus tôt, expliquant le rebond observé dans la production de HIF-1 $\alpha$ . Après exposition à 100 % d'oxygène, NRF2 et NF- $\kappa$ B sont surexprimés, tandis qu'à 30 %, seule NRF2 est stimulée.*

Nos résultats pourraient s'expliquer par les besoins cellulaires en seconds messagers, tels que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comme médiateurs susceptibles d'agir via l'activation de NRF2, induisant la libération de l'expression de keap1 [272]. Bien qu'il soit désormais admis que HIF-1 $\alpha$  est le principal agent de régulation de l'homéostasie en cas d'hypoxie [273] et d'hyperoxie [73], d'autres facteurs régulateurs doivent être pris en compte, comme le NRF2. Par exemple, le facteur de transcription silencieux de l'élément répresseur 1 (REST) est un inhibiteur nucléaire connu de la synthèse de HIF-1 $\alpha$  [274]. Lors d'une exposition à l'hypoxie, REST s'accumule dans le noyau avec une multiplication par quatre par rapport à la normoxie. Ceci peut être rapidement inversé par la réoxygénation [275]. À notre connaissance, l'évaluation de REST dans l'hyperoxie n'a pas encore été étudiée. Cependant, en gardant à l'esprit que le Normobaric Oxygen Paradox (NOP) a la capacité d'imiter l'hypoxie [70, 199, 276] et constitue donc un outil puissant pour déclencher une réponse hormétique. Il pourrait donc être utilisé comme une hypothèse raisonnable pour suggérer que plus le delta de l'hyperoxie est faible, plus l'oxydation permissive est longue, permettant aux messagers cellulaires secondaires (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de potentialiser leur rôle de transcription nucléaire et de déclencher une réponse forte et rapide (dans les 3 premières heures) [11]. En effet, des données récentes démontrent que les changements épigénétiques par méthylation/déméthylation lors de l'expression génique sont liés à l'homéostasie de l'oxygène [277]. La cinétique de ces mécanismes d'activation/désactivation induits par l'oxygène dépend de réactions enzymatiques où le rôle de la 2-oxoglutarate dioxygénase semble déterminant [278]. Parallèlement, cela pourrait s'expliquer par une cinétique plus lente des défenses intracellulaires. En effet, nous avons récemment démontré qu'après une exposition à 30 % d'oxygène, la synthèse du glutathion

n'est efficace qu'au bout de 24 h, alors qu'après une exposition à 100 %, sa synthèse et sa libération se produisent plus tôt, environ 3 h après l'exposition [71]. Cette dernière étude a également démontré que la réponse inflammatoire était différente entre ces deux affections (30 % et 100 %).

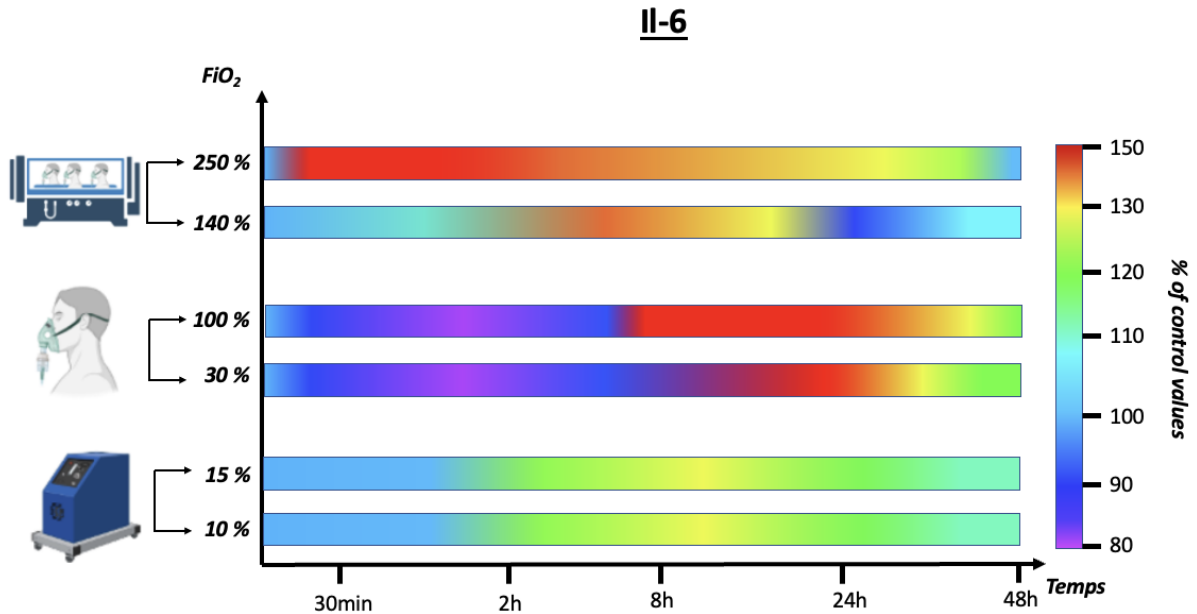
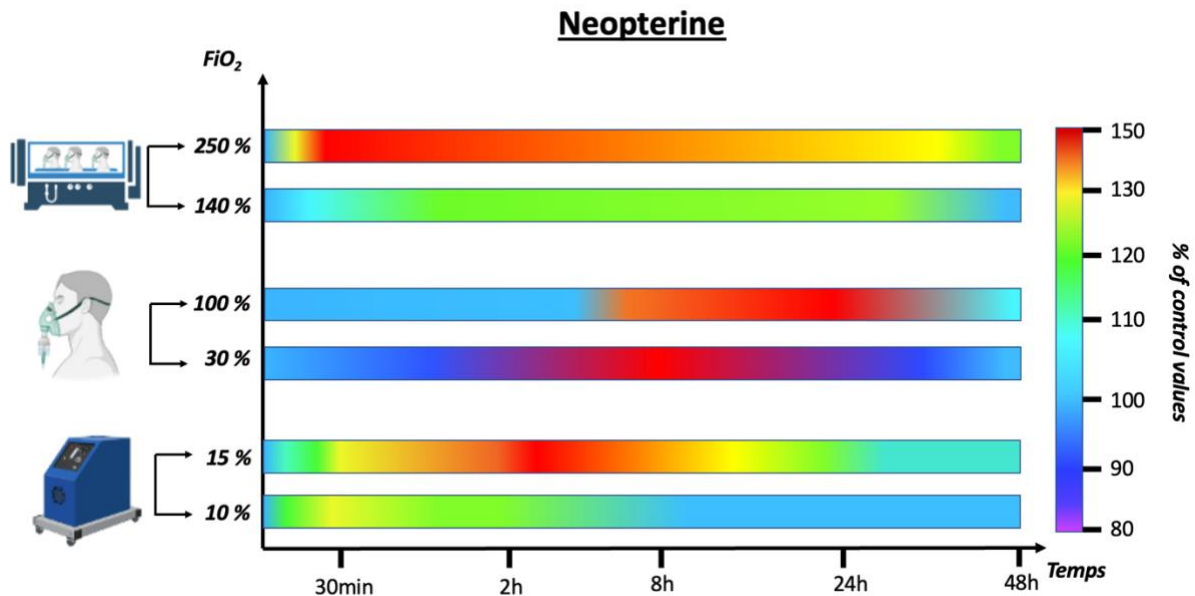


Figure 24 : Cinétique de l'expression de l'IL-6 en fonction de la FiO<sub>2</sub> :

Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post /pré \*100).

En effet, l'hypoxie normobare aiguë stimule la production d'IL-6, cytokine pro-inflammatoire, et la polarisation des macrophages M1. L'IL-6 est augmentée via l'induction du facteur nucléaire kappa B (NF-κB)[279]. De plus, l'IL-6 (restant significativement élevée pendant 48 h) favorise la voie de signalisation NRF-2 par un rétrocontrôle positif qui permet l'expression de gènes antioxydants et maintient l'équilibre rédox [280]. Pour finir, il a été récemment démontré que NRF2 joue un rôle clé en fournissant les conditions préalables à l'hypoxie normobare afin d'améliorer l'endurance à l'effort [281].

Contrairement à l'hypoxie, en condition hyperoxique normobare nous constatons l'inhibition de l'IL-6 dans les deux heures suivant l'exposition pouvant s'expliquer par une répression de sa synthèse liée à l'activation parallèle de NRF2[282]. La plus grande amplitude d'expression de l'IL-6 après une exposition à 100 % suggère un changement dans la voie de NRF2/NF-κB [71, 283].



**Figure 25 : Cinétique de l'expression de la néoptérine en fonction de la  $FiO_2$  :**

Les résultats sont exprimés dans la carte thermique en tant que pourcentage de variation entre les valeurs avant et après exposition (post /pré \*100).

La concentration croissante de néoptérine peut être surveillée en médecine pour évaluer le niveau d'inflammation clinique résultant d'un traumatisme physique, de maladies cardiovasculaires, de cancers et d'infections bactériennes, parasitaires et/ou virales [64-68]. Nos résultats mettent en évidence que la néoptérine partage un schéma similaire à l'IL-6, allant de l'inhibition à la surexpression, avec un retour à la ligne de base dans les 24 heures. Puisque cette molécule est révélatrice d'un effet pro-inflammatoire avec le recrutement de l'immunité cellulaire et l'induction de l'apoptose, son schéma pourrait suggérer la possibilité que le NOP soit capable de produire une immunomodulation. Cependant, pour atteindre des niveaux de modulation significatifs, davantage de séances sont possiblement nécessaires, comme cela a été démontré récemment pour 30 % et 100 % de  $FiO_2$  après 5 semaines de séances régulières trois fois par semaine [201].

Une augmentation rapide de la néoptérine a également été observée (après 2 h) suite au pic de ROS sans raisons pathologiques puisque le stimulus hypoxique était de courte durée et qu'aucune autre situation nocive (traumatisme, maladies cardiovasculaires, etc.) n'était présente. Cette réaction rapide est intéressante, car elle contrecarrerait le complexe inflammatoire favorisant la voie NRF2, comme déjà montré suite à de légères « oxy-inflammation » de 60 min [71]. Ce résultat est très intéressant dans le cadre de protocoles de préconditionnement visant à inhiber les inflammasomes [284]. Il est intéressant de noter que la modulation de la néoptérine est inversement proportionnelle à l'importance de l'hypoxie. En effet, nous avons observé une augmentation plus importante de la néoptérine après exposition à 15 % d'oxygène qu'après exposition à 10 % d'oxygène. Nous pensons qu'une augmentation plus importante de la production de ROS induite par l'hyperoxie pourrait contribuer à cette différence, comme cela a déjà été démontré récemment dans l'hyperoxie modérée par rapport à l'hypoxie (oxy-inflammation) [201].

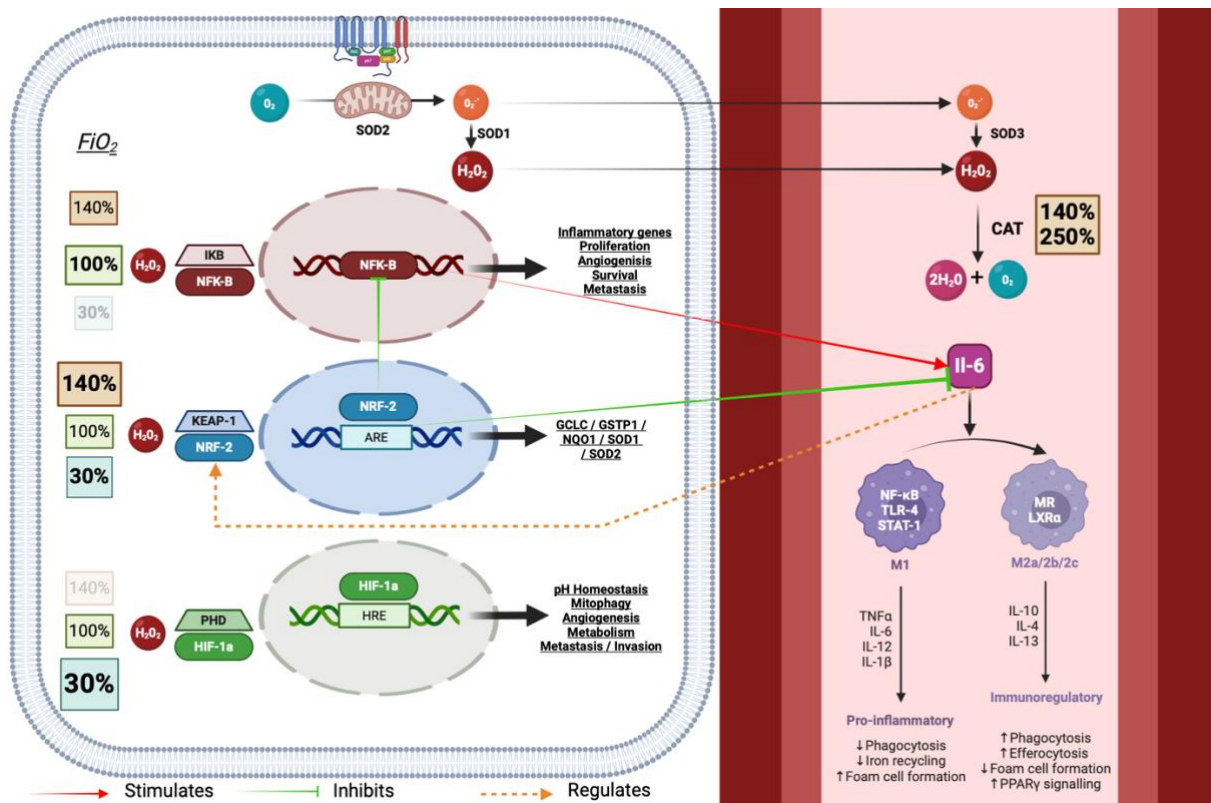


Figure 26 Concept DeltOx : Effet de l'hyperoxie aiguë à différentes pressions partielles d'oxygène.

Lors de ces interventions, le retour à la normoxie après une hyperoxie légère ( $FiO_2$  30%) est ressenti comme un stress hypoxique sans activation significative du NF- $\kappa$ B. À l'inverse, une hyperoxie élevée ( $FiO_2$  100%) et très élevée ( $FiO_2$  140%), induit une réponse simultanée du stress oxydant et inflammatoire, caractérisé par l'activation respective de NRF2 et de NF- $\kappa$ B au cours des 24 premières heures suivant l'exposition. Par ailleurs, hyperoxie légère ( $FiO_2$  30%) élevée ( $FiO_2$  100%) stimulent la production du HIF-1 $\alpha$  contrairement à l'hyperoxie très élevée ( $FiO_2$  140%) qui ne stimule pas le HIF-1 $\alpha$ . En cas d'hyperoxie hyperbare aiguë, on observe une augmentation de la production d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire, ainsi que la polarisation des macrophages M1, stimulées par l'induction du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B). De plus, l'IL-6 maintient un niveau élevé pendant 48 heures, favorisant la voie de signalisation NRF-2 par un rétrocontrôle positif, ce qui permet l'expression de gènes antioxydants et maintient l'équilibre rédox. En revanche, en condition hyperoxie normobare, l'IL-6 est inhibée dans les deux heures suivant l'exposition, probablement en raison d'une répression de sa synthèse liée à l'activation simultanée de NRF2. L'amplitude plus élevée de l'expression de l'IL-6 après une exposition à 100 %  $FiO_2$  et supérieur suggère un changement dans la voie de signalisation NRF2/NF- $\kappa$ B. Pour finir, seules les expositions en hyperoxie hyperbare à 140% et 250% de  $FiO_2$  permettent la production de la Catalase.

# Conclusion

La conception de l'oxygène moléculaire et de ses effets sur les organismes continue d'évoluer, dépassant son rôle traditionnel de fournisseur d'énergie pour les processus métaboliques. Les variations d'oxygène, qu'elles soient en termes de concentration, de pression, ou de modalités d'exposition, révèlent des réponses cellulaires complexes et parfois paradoxales. De l'histoire géologique de la Terre aux applications thérapeutiques modernes, l'oxygène demeure un acteur central.

Suivant l'exposition de sujets sains à des pressions partielles d'oxygène diverses nous avons mis en évidence une différence en termes de quantité de réaction et de cinétique. En hypoxie normobare, nous avons noté un pic de ROS à 30min après une heure d'exposition sans activation d'une contre mesure anti oxydante. Par ailleurs, nous notons une augmentation progressive de l'IL-6 avec un pic à 8h, signifiant une augmentation évolutive et lente de l'inflammation.

En hyperoxie normobare, nous constatons une augmentation plus tardive de la production de ROS à 2h après une heure d'exposition également sans réaction anti oxydante. De plus, cette exposition est la seule à produire une réponse biphasique de l'interleukine 6 comprenant une inhibition maximum à 2h post exposition et un pic réactionnel avec un maximum de production à 24h avec un retour à la ligne de base après 48h. En hyperoxie hyperbare, nous avons mis en évidence une augmentation rapide et soutenu jusqu'à 48 des ROS, sans différence significative entre une exposition d'une heure à 140% et 250% de FiO<sub>2</sub>. Cela semble indiquer un effet seuil face à l'exposition excessive d'oxygène. Par ailleurs, l'hyperoxie hyperbare est la seule modalité qui stimule la production de la catalase de manière rapide (pic à 30min) et soutenue au-delà de 48h, démontrant une activation des mécanismes de protections de l'organisme face à l'action oxydante et néfaste à long terme du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Les nouvelles approches thérapeutiques, notamment dans le domaine de l'oxygénothérapie hyperbare, mettent en évidence la nécessité de reconsidérer la vision traditionnelle de Paracelse selon laquelle "la dose fait le poison". Les résultats de diverses études soulignent que les réponses cellulaires à l'oxygène ne suivent pas une relation linéaire prévisible. Nos recherches actuelles remettent en question certaines notions établies, illustrées par nos études sur les réponses métaboliques, inflammatoires et oxydatives à différentes concentrations et pressions d'oxygène.

En effet, ce travail révèle une réponse biphasique au fil du temps, débutant par une "oxydation permissive" avec un seuil déclencheur conduisant à une surexpression de l'inflammation et de l'oxydation, remettant en question le rôle prédominant du système de protection antioxydant. Par ailleurs, des réactions physiologiques similaires semblent être présentes pour les deux doses d'oxygène très différentes (1,4 et 2,5 ATA) concernant les stratégies d'adaptation antioxydante. Cependant, l'immunomodulation et les réponses

inflammatoires, au contraire, semblent répondre proportionnellement à la dose d'oxygène hyperbare.

Ces résultats renforcent l'idée que l'hormèse cellulaire résulte de processus complexes, impliquant une orchestration entre l'augmentation des ROS, l'inflammation, le métabolisme, et potentiellement l'expression génique. L'importance d'une exploration approfondie de la cinétique des réactions enzymatiques liées à la biogenèse moléculaire intracellulaire est primordiale pour optimiser les résultats, notamment dans la définition de protocoles d'entraînement, thérapeutiques ou de réadaptation, visant une utilisation plus ciblée de l'oxygène.

L'image complexe qui émerge de ces travaux suggère que l'oxygène agit comme un déclencheur puissant de réponses cellulaires, et qu'une compréhension approfondie est cruciale pour envisager les avantages thérapeutiques tout en minimisant les risques potentiels. Les recherches contemporaines mettent en lumière la nécessité de considérer la variabilité des réponses cellulaires à différentes pressions partielles d'oxygène. En fin de compte, la biologie de l'oxygène reste un domaine de recherche dynamique et fructueux. Les nouvelles perspectives offertes par les études actuelles ouvrent la voie à des avancées significatives dans la compréhension de la manière dont les organismes interagissent avec cet élément fondamental. À mesure que la recherche progresse, il est clair que la relation entre les niveaux d'oxygène et les réponses cellulaires est loin d'être linéaire, laissant un terrain fertile pour de futures découvertes passionnantes dans ce domaine dynamique de la physiologie.

## Références Bibliographique

1. Nunn, J. F., Evolution of the atmosphere. *Proceedings of the Geologists' Association* **1998**, 109, (1), 1-13.
2. Martin, D.; McKenna, H.; Livina, V., The human physiological impact of global deoxygenation. *The Journal of Physiological Sciences* **2017**, 67, (1), 97-106.
3. Petsch, S. T. In *10.11 – The Global Oxygen Cycle*, 2014; 2014.
4. Rolfe, D. F.; Brown, G. C., Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* **1997**, 77, (3), 731-58.
5. Schottlender, N.; Gottfried, I.; Ashery, U., Hyperbaric Oxygen Treatment: Effects on Mitochondrial Function and Oxidative Stress. *Biomolecules* **2021**, 11, (12), 1827.
6. Sibson, N. R.; Dhankhar, A.; Mason, G. F.; Rothman, D. L.; Behar, K. L.; Shulman, R. G., Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, 95, (1), 316-21.
7. Siems, W. G.; Sommerburg, O.; Grune, T., Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol* **2000**, 53, (1 Suppl), S9-17.
8. Stanley, W. C.; Recchia, F. A.; Lopaschuk, G. D., Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* **2005**, 85, (3), 1093-129.
9. Yin, Z.; Burger, N.; Kula-Alwar, D.; Aksentijević, D.; Bridges, H. R.; Prag, H. A.; Grba, D. N.; Viscomi, C.; James, A. M.; Mottahedin, A.; Krieg, T.; Murphy, M. P.; Hirst, J., Structural basis for a complex I mutation that blocks pathological ROS production. *Nat Commun* **2021**, 12, (1), 707.
10. van Vliet, T.; Casciaro, F.; Demaria, M., To breathe or not to breathe: Understanding how oxygen sensing contributes to age-related phenotypes. *Ageing Res Rev* **2021**, 67, 101267.
11. Sies, H., Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* **2014**, 289, (13), 8735-41.
12. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P., Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem* **2017**, 86, 715-748.
13. D'Autréaux, B.; Toledano, M. B., ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, 8, (10), 813-24.
14. Finkel, T.; Holbrook, N. J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**, 408, (6809), 239-47.
15. Stone, J. R.; Yang, S., Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* **2006**, 8, (3-4), 243-70.
16. Winterbourn, C. C., Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide. *Antioxid Redox Signal* **2018**, 29, (6), 541-551.
17. Winterbourn, C. C., Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **2008**, 4, (5), 278-86.
18. Sies, H., Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **2017**, 11, 613-619.
19. Holmström, K. M.; Finkel, T., Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, 15, (6), 411-21.
20. Paulsen, C. E.; Carroll, K. S., Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. *Chemical Reviews* **2013**, 113, (7), 4633-4679.
21. Rhee, S. G., Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* **1999**, 31, (2), 53-9.

22. Extracellular Matrix and Redox Signaling in Cellular Responses to Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **2017**, 27, (12), 771-773.
23. Sen, C. K.; Roy, S., Redox signals in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2008**, 1780, (11), 1348-1361.
24. Singla, B.; Holmdahl, R.; Csanyi, G., Editorial: Oxidants and Redox Signaling in Inflammation. *Frontiers in Immunology* **2019**, 10.
25. Lambeth, J. D., NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* **2004**, 4, (3), 181-189.
26. Sies, H.; Jones, D. P., Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, 21, (7), 363-383.
27. Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, 33, (3), 337-349.
28. Bienert, G. P.; Chaumont, F., Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, 1840, (5), 1596-1604.
29. Veal, E. A.; Day, A. M.; Morgan, B. A., Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell* **2007**, 26, (1), 1-14.
30. Kelley, E. E.; Khoo, N. K. H.; Hundley, N. J.; Malik, U. Z.; Freeman, B. A.; Tarpey, M. M., Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, 48, (4), 493-498.
31. Nisimoto, Y.; Diebold, B. A.; Cosentino-Gomes, D.; Lambeth, J. D., Nox4: A Hydrogen Peroxide-Generating Oxygen Sensor. *Biochemistry* **2014**, 53, (31), 5111-5120.
32. Brigelius-Flohé, R.; Flohé, L., Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal* **2020**, 33, (7), 498-516.
33. Rhee, S. G.; Kil, I. S., Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu Rev Biochem* **2017**, 86, 749-775.
34. Biteau, B.; Labarre, J.; Toledano, M. B., ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **2003**, 425, (6961), 980-4.
35. Chang, T.-S.; Jeong, W.; Woo, H. A.; Lee, S. M.; Park, S.; Rhee, S. G., Characterization of Mammalian Sulphiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine\*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (49), 50994-51001.
36. Woo, H. A.; Jeong, W.; Chang, T.-S.; Park, K. J.; Park, S. J.; Yang, J. S.; Rhee, S. G., Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulphiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins\*. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, (5), 3125-3128.
37. Bagur, R.; Hajnóczky, G., Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* **2017**, 66, (6), 780-788.
38. Sies, H.; Chance, B., The steady state level of catalase compound I in isolated hemoglobin-free perfused rat liver. *FEBS Letters* **1970**, 11, (3), 172-176.
39. Parvez, S.; Long, M. J. C.; Poganik, J. R.; Aye, Y., Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants. *Chem Rev* **2018**, 118, (18), 8798-8888.
40. Zhang, L.; Wang, X.; Cueto, R.; Effi, C.; Zhang, Y.; Tan, H.; Qin, X.; Ji, Y.; Yang, X.; Wang, H., Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol* **2019**, 26, 101284.



41. Sies, H., Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol* **2021**, 41, 101867.
42. Ristow, M.; Zarse, K., How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp Gerontol* **2010**, 45, (6), 410-8.
43. Ristow, M.; Schmeisser, K., Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response* **2014**, 12, (2), 288-341.
44. Calabrese, E., Hormesis: Path and Progression to Significance. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19, (10), 2871.
45. Forman, H. J.; Bernardo, A.; Davies, K. J., What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch Biochem Biophys* **2016**, 603, 48-53.
46. Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M.; Nabeshima, Y., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, 236, (2), 313-22.
47. Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Motohashi, H., The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev* **2018**, 98, (3), 1169-1203.
48. DeBlasi, J. M.; DeNicola, G. M., Dissecting the Crosstalk between NRF2 Signaling and Metabolic Processes in Cancer. *Cancers* **2020**, 12, (10), 3023.
49. Mitsuishi, Y.; Taguchi, K.; Kawatani, Y.; Shibata, T.; Nukiwa, T.; Aburatani, H.; Yamamoto, M.; Motohashi, H., Nrf2 Redirects Glucose and Glutamine into Anabolic Pathways in Metabolic Reprogramming. *Cancer Cell* **2012**, 22, (1), 66-79.
50. Marinho, H. S.; Real, C.; Cyrne, L.; Soares, H.; Antunes, F., Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol* **2014**, 2, 535-62.
51. Kobayashi, M.; Li, L.; Iwamoto, N.; Nakajima-Takagi, Y.; Kaneko, H.; Nakayama, Y.; Eguchi, M.; Wada, Y.; Kumagai, Y.; Yamamoto, M., The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol Cell Biol* **2009**, 29, (2), 493-502.
52. Lennicke, C.; Cochemé, H. M., Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* **2021**, 81, (18), 3691-3707.
53. Karin, M., NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2009**, 1, (5), a000141.
54. Pahl, H. L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **1999**, 18, (49), 6853-66.
55. Oliveira-Marques, V.; Marinho, H. S.; Cyrne, L.; Antunes, F., Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid Redox Signal* **2009**, 11, (9), 2223-43.
56. Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, P. A., Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo j* **1991**, 10, (8), 2247-58.
57. Selective Oxidative Stress in Cell Nuclei by Nuclear-Targeted D-Amino Acid Oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, 9, (7), 807-816.

58. Matthews, J. R.; Wakasugi, N.; virelizier, J.-L.; Yodoi, J.; Hay, R. T., Thiordoxin regulates the DNA binding activity of NF- $\chi$ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, (15), 3821-3830.
59. Reynaert, N. L.; van der Vliet, A.; Guala, A. S.; McGovern, T.; Hristova, M.; Pantano, C.; Heintz, N. H.; Heim, J.; Ho, Y.-S.; Matthews, D. E.; Wouters, E. F. M.; Janssen-Heininger, Y. M. W., Dynamic redox control of NF- $\kappa$ B through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory  $\kappa$ B kinase  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103, (35), 13086-13091.
60. Halvey, P. J.; Hansen, J. M.; Johnson, J. M.; Go, Y. M.; Samali, A.; Jones, D. P., Selective oxidative stress in cell nuclei by nuclear-targeted D-amino acid oxidase. *Antioxid Redox Signal* **2007**, 9, (7), 807-16.
61. Kaelin, W. G., Jr.; Ratcliffe, P. J., Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* **2008**, 30, (4), 393-402.
62. Jiang, B. H.; Rue, E.; Wang, G. L.; Roe, R.; Semenza, G. L., Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **1996**, 271, (30), 17771-8.
63. Hernansanz-Agustín, P.; Ramos, E.; Navarro, E.; Parada, E.; Sánchez-López, N.; Peláez-Aguado, L.; Cabrera-García, J. D.; Tello, D.; Buendia, I.; Marina, A.; Egea, J.; López, M. G.; Bogdanova, A.; Martínez-Ruiz, A., Mitochondrial complex I deactivation is related to superoxide production in acute hypoxia. *Redox Biol* **2017**, 12, 1040-1051.
64. Prabhakar, N. R.; Kumar, G. K.; Nanduri, J.; Semenza, G. L., ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal* **2007**, 9, (9), 1397-403.
65. Waypa, G. B.; Smith, K. A.; Schumacker, P. T., O<sub>2</sub> sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. *Mol Aspects Med* **2016**, 47-48, 76-89.
66. Chandel, N. S.; McClintock, D. S.; Feliciano, C. E.; Wood, T. M.; Melendez, J. A.; Rodriguez, A. M.; Schumacker, P. T., Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem* **2000**, 275, (33), 25130-8.
67. Lee, G.; Won, H. S.; Lee, Y. M.; Choi, J. W.; Oh, T. I.; Jang, J. H.; Choi, D. K.; Lim, B. O.; Kim, Y. J.; Park, J. W.; Puigserver, P.; Lim, J. H., Oxidative Dimerization of PHD2 is Responsible for its Inactivation and Contributes to Metabolic Reprogramming via HIF-1 $\alpha$  Activation. *Sci Rep* **2016**, 6, 18928.
68. Pouyssegur, J.; Mechta-Grigoriou, F., Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol Chem* **2006**, 387, (10-11), 1337-46.
69. Acker, T.; Fandrey, J.; Acker, H., The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res* **2006**, 71, (2), 195-207.
70. Balestra, C.; Germonpré, P.; Poortmans, J. R.; Marroni, A., Serum erythropoietin levels in healthy humans after a short period of normobaric and hyperbaric oxygen breathing: the "normobaric oxygen paradox". *J Appl Physiol (1985)* **2006**, 100, (2), 512-8.
71. Fratantonio, D.; Virgili, F.; Zucchi, A.; Lambrechts, K.; Latronico, T.; Lafere, P.; Germonpre, P.; Balestra, C., Increasing Oxygen Partial Pressures Induce a Distinct Transcriptional Response in Human PBMC: A Pilot Study on the "Normobaric Oxygen Paradox". *Int J Mol Sci* **2021**, 22, (1).

72. De Bels, D.; Corazza, F.; Germonpre, P.; Balestra, C., The normobaric oxygen paradox: a novel way to administer oxygen as an adjuvant treatment for cancer? *Med Hypotheses* **2011**, 76, (4), 467-70.
73. Cimino, F.; Balestra, C.; Germonpre, P.; De Bels, D.; Tillmans, F.; Saija, A.; Speciale, A.; Virgili, F., Pulsed high oxygen induces a hypoxic-like response in human umbilical endothelial cells and in humans. *J Appl Physiol (1985)* **2012**, 113, (11), 1684-9.
74. Valacchi, G.; Virgili, F.; Cervellati, C.; Pecorelli, A., OxInflammation: From Subclinical Condition to Pathological Biomarker. *Front Physiol* **2018**, 9, 858.
75. Ursini, F.; Maiorino, M.; Forman, H. J., Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biol* **2016**, 8, 205-15.
76. Volkman, R.; Ben-Zur, T.; Kahana, A.; Garty, B. Z.; Offen, D., Myeloperoxidase Deficiency Inhibits Cognitive Decline in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* **2019**, 13, 990.
77. Cervellati, C.; Zuliani, G.; Valacchi, G., OxInflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* **2023**, 18, (12), 2709-2710.
78. Ma, M. W.; Wang, J.; Zhang, Q.; Wang, R.; Dhandapani, K. M.; Vadlamudi, R. K.; Brann, D. W., NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener* **2017**, 12, (1), 7.
79. Medzhitov, R., Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* **2010**, 140, (6), 771-776.
80. Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O. H.; Andersen, P. S.; Girardin, S. E., Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol* **2007**, 147, (2), 227-35.
81. Nathan, C.; Ding, A., Nonresolving inflammation. *Cell* **2010**, 140, (6), 871-82.
82. Zhou, Y.; Hong, Y.; Huang, H., Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res* **2016**, 41, (6), 901-910.
83. Brusselle, G.; Bracke, K., Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc* **2014**, 11 Suppl 5, S322-8.
84. Gudkov, A. V.; Komarova, E. A., p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2016**, 6, (11).
85. Takeuchi, O.; Akira, S., Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**, 140, (6), 805-20.
86. Czerkies, M.; Kwiatkowska, K., Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Medical Journal of Cell Biology* **2014**, 4, (1), 1-23.
87. Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T., Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2001**, 2, (8), 675-80.
88. Adib-Conquy, M.; Cavillon, J. M., Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett* **2007**, 581, (19), 3723-33.
89. Rubartelli, A.; Lotze, M. T., Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* **2007**, 28, (10), 429-36.
90. Kaminska, B., MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1754, (1-2), 253-62.

91. Hendrayani, S. F.; Al-Harbi, B.; Al-Ansari, M. M.; Silva, G.; Aboussekhra, A., The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- $\kappa$ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* **2016**, *7*, (27), 41974-41985.
92. Kyriakis, J. M.; Avruch, J., Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **2001**, *81*, (2), 807-69.
93. Henríquez-Olguín, C.; Altamirano, F.; Valladares, D.; López, J. R.; Allen, P. D.; Jaimovich, E., Altered ROS production, NF- $\kappa$ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1852*, (7), 1410-9.
94. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L., Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **2018**, *9*, (6), 7204-7218.
95. Girard, S.; Kadhim, H.; Roy, M.; Lavoie, K.; Brochu, M. E.; Larouche, A.; Sébire, G., Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* **2009**, *40*, (3), 168-74.
96. Moynagh, P. N., The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* **2005**, *118*, (Pt 20), 4589-92.
97. Hoffmann, A.; Natoli, G.; Ghosh, G., Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **2006**, *25*, (51), 6706-16.
98. Pasparakis, M.; Luedde, T.; Schmidt-Supprian, M., Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* **2006**, *13*, (5), 861-72.
99. Basak, S.; Kim, H.; Kearns, J. D.; Tergaonkar, V.; O'Dea, E.; Werner, S. L.; Benedict, C. A.; Ware, C. F.; Ghosh, G.; Verma, I. M.; Hoffmann, A., A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* **2007**, *128*, (2), 369-81.
100. Hayden, M. S.; Ghosh, S., NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* **2012**, *26*, (3), 203-34.
101. Pearson, G.; Robinson, F.; Beers Gibson, T.; Xu, B. E.; Karandikar, M.; Berman, K.; Cobb, M. H., Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **2001**, *22*, (2), 153-83.
102. Kim, E. K.; Choi, E. J., Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1802*, (4), 396-405.
103. Sabio, G.; Davis, R. J., TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* **2014**, *26*, (3), 237-45.
104. Raingeaud, J.; Whitmarsh, A. J.; Barrett, T.; Dérijard, B.; Davis, R. J., MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, (3), 1247-55.
105. O'Shea, J. J.; Schwartz, D. M.; Villarino, A. V.; Gadina, M.; McInnes, I. B.; Laurence, A., The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **2015**, *66*, 311-28.
106. Walker, J. G.; Smith, M. D., The Jak-STAT pathway in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **2005**, *32*, (9), 1650-3.
107. Ivashkiv, L. B.; Hu, X., The JAK/STAT pathway in rheumatoid arthritis: pathogenic or protective? *Arthritis Rheum* **2003**, *48*, (8), 2092-6.
108. Boengler, K.; Hilfiker-Kleiner, D.; Drexler, H.; Heusch, G.; Schulz, R., The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther* **2008**, *120*, (2), 172-85.

109. Oeckinghaus, A.; Hayden, M. S.; Ghosh, S., Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat Immunol* **2011**, 12, (8), 695-708.
110. Iwasaki, A.; Medzhitov, R., Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2004**, 5, (10), 987-95.
111. Opitz, B.; van Laak, V.; Eitel, J.; Suttorp, N., Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* **2010**, 181, (12), 1294-309.
112. Rahman, I.; Adcock, I. M., Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* **2006**, 28, (1), 219-42.
113. Cesari, M.; Penninx, B. W.; Newman, A. B.; Kritchevsky, S. B.; Nicklas, B. J.; Sutton-Tyrrell, K.; Rubin, S. M.; Ding, J.; Simonsick, E. M.; Harris, T. B.; Pahor, M., Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* **2003**, 108, (19), 2317-22.
114. Bhowmick, S.; Moore, J. T.; Kirschner, D. L.; Drew, K. L., Arctic ground squirrel hippocampus tolerates oxygen glucose deprivation independent of hibernation season even when not hibernating and after ATP depletion, acidosis, and glutamate efflux. *J Neurochem* **2017**, 142, (1), 160-170.
115. Pecoits-Filho, R.; Heimbürger, O.; Bárány, P.; Suliman, M.; Fehrman-Ekholm, I.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P., Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis* **2003**, 41, (6), 1212-8.
116. Ross, A. C.; Rizk, N.; O'Riordan, M. A.; Dogra, V.; El-Bejjani, D.; Storer, N.; Harrill, D.; Tungsiripat, M.; Adell, J.; McComsey, G. A., Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **2009**, 49, (7), 1119-27.
117. Pai, J. K.; Pischon, T.; Ma, J.; Manson, J. E.; Hankinson, S. E.; Joshipura, K.; Curhan, G. C.; Rifai, N.; Cannuscio, C. C.; Stampfer, M. J.; Rimm, E. B., Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* **2004**, 351, (25), 2599-610.
118. Bautista, L. E.; Vera, L. M.; Arenas, I. A.; Gamarra, G., Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J Hum Hypertens* **2005**, 19, (2), 149-54.
119. Lindahl, B.; Toss, H.; Siegbahn, A.; Venge, P.; Wallentin, L., Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* **2000**, 343, (16), 1139-47.
120. Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. J., Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* **2014**, 1843, (11), 2563-2582.
121. Czaja, A. J., Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* **2014**, 20, (10), 2515-32.
122. Liu, Z.; Wang, Y.; Wang, Y.; Ning, Q.; Zhang, Y.; Gong, C.; Zhao, W.; Jing, G.; Wang, Q., Dexmedetomidine attenuates inflammatory reaction in the lung tissues of septic mice by activating cholinergic anti-inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol* **2016**, 35, 210-216.
123. Eckersall, P. D.; Bell, R., Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* **2010**, 185, (1), 23-7.

124. Murata, H.; Shimada, N.; Yoshioka, M., Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* **2004**, 168, (1), 28-40.
125. Murakami, A.; Ohigashi, H., Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer* **2007**, 121, (11), 2357-63.
126. Lopresti, A. L.; Maker, G. L.; Hood, S. D.; Drummond, P. D., A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **2014**, 48, 102-11.
127. Huang, W.; Tang, Y.; Li, L., HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* **2010**, 51, (2), 119-26.
128. Schierbeck, H.; Lundbäck, P.; Palmblad, K.; Klevenvall, L.; Erlandsson-Harris, H.; Andersson, U.; Ottosson, L., Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol Med* **2011**, 17, (9-10), 1039-44.
129. Cheng, Y.; Wang, D.; Wang, B.; Li, H.; Xiong, J.; Xu, S.; Chen, Q.; Tao, K.; Yang, X.; Zhu, Y.; He, S., HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway. *Mol Biol Cell* **2017**, 28, (1), 201-209.
130. Asavarut, P.; Zhao, H.; Gu, J.; Ma, D., The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury. *Acta Anaesthesiol Taiwan* **2013**, 51, (1), 28-33.
131. Park, J.; Min, J. S.; Kim, B.; Chae, U. B.; Yun, J. W.; Choi, M. S.; Kong, I. K.; Chang, K. T.; Lee, D. S., Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Neurosci Lett* **2015**, 584, 191-6.
132. Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B., Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* **2010**, 49, (11), 1603-16.
133. Stramer, B. M.; Mori, R.; Martin, P., The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* **2007**, 127, (5), 1009-17.
134. Nathan, C., Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **2006**, 6, (3), 173-82.
135. Jabbour, H. N.; Sales, K. J.; Catalano, R. D.; Norman, J. E., Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* **2009**, 138, (6), 903-19.
136. Aggrey, A. A.; Srivastava, K.; Ture, S.; Field, D. J.; Morrell, C. N., Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol* **2013**, 190, (9), 4685-91.
137. Headland, S. E.; Norling, L. V., The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol* **2015**, 27, (3), 149-60.
138. Reville, K.; Crean, J. K.; Vivers, S.; Dransfield, I.; Godson, C., Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol* **2006**, 176, (3), 1878-88.
139. Serhan, C. N.; Savill, J., Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* **2005**, 6, (12), 1191-7.
140. Lintermans, L. L.; Stegeman, C. A.; Heeringa, P.; Abdulahad, W. H., T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol* **2014**, 5, 504.
141. Sugimoto, M. A.; Sousa, L. P.; Pinho, V.; Perretti, M.; Teixeira, M. M., Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol* **2016**, 7, 160.

142. Hirano, T.; Taga, T.; Nakano, N.; Yasukawa, K.; Kashiwamura, S.; Shimizu, K.; Nakajima, K.; Pyun, K. H.; Kishimoto, T., Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, (16), 5490-4.
143. Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T., IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2014**, *6*, (10), a016295.
144. Pedersen, B. K.; Akerström, T. C.; Nielsen, A. R.; Fischer, C. P., Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol (1985)* **2007**, *103*, (3), 1093-8.
145. Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S., The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1813*, (5), 878-88.
146. Ruderman, N. B.; Keller, C.; Richard, A. M.; Saha, A. K.; Luo, Z.; Xiang, X.; Giralt, M.; Ritov, V. B.; Menshikova, E. V.; Kelley, D. E.; Hidalgo, J.; Pedersen, B. K.; Kelly, M., Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* **2006**, *55* Suppl 2, S48-54.
147. Wang, X.; Bao, W.; Liu, J.; Ouyang, Y. Y.; Wang, D.; Rong, S.; Xiao, X.; Shan, Z. L.; Zhang, Y.; Yao, P.; Liu, L. G., Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **2013**, *36*, (1), 166-75.
148. Kistner, T. M.; Pedersen, B. K.; Lieberman, D. E., Interleukin 6 as an energy allocator in muscle tissue. *Nature Metabolism* **2022**, *4*, (2), 170-179.
149. McElvaney, O. J.; Curley, G. F.; Rose-John, S.; McElvaney, N. G., Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. *Lancet Respir Med* **2021**, *9*, (6), 643-654.
150. van Hall, G.; Steensberg, A.; Sacchetti, M.; Fischer, C.; Keller, C.; Schjerling, P.; Hiscock, N.; Møller, K.; Saltin, B.; Febbraio, M. A.; Pedersen, B. K., Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**, *88*, (7), 3005-10.
151. Wolsk, E.; Mygind, H.; Grøndahl, T. S.; Pedersen, B. K.; van Hall, G., IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2010**, *299*, (5), E832-40.
152. Wedell-Neergaard, A. S.; Lang Lehrskov, L.; Christensen, R. H.; Legaard, G. E.; Dorph, E.; Larsen, M. K.; Launbo, N.; Fagerlind, S. R.; Seide, S. K.; Nymand, S.; Ball, M.; Vinum, N.; Dahl, C. N.; Henneberg, M.; Ried-Larsen, M.; Nybing, J. D.; Christensen, R.; Rosenmeier, J. B.; Karstoft, K.; Pedersen, B. K.; Ellingsgaard, H.; Krogh-Madsen, R., Exercise-Induced Changes in Visceral Adipose Tissue Mass Are Regulated by IL-6 Signaling: A Randomized Controlled Trial. *Cell Metab* **2019**, *29*, (4), 844-855.e3.
153. Ellingsgaard, H.; Hauselmann, I.; Schuler, B.; Habib, A. M.; Baggio, L. L.; Meier, D. T.; Eppler, E.; Bouzakri, K.; Wueest, S.; Muller, Y. D.; Hansen, A. M.; Reinecke, M.; Konrad, D.; Gassmann, M.; Reimann, F.; Halban, P. A.; Gromada, J.; Drucker, D. J.; Gribble, F. M.; Ehses, J. A.; Donath, M. Y., Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med* **2011**, *17*, (11), 1481-9.
154. Timper, K.; Denson, J. L.; Steculorum, S. M.; Heiling, C.; Engström-Ruud, L.; Wunderlich, C. M.; Rose-John, S.; Wunderlich, F. T.; Brüning, J. C., IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling. *Cell Rep* **2017**, *19*, (2), 267-280.

155. Ellingsgaard, H.; Seelig, E.; Timper, K.; Coslovsky, M.; Soederlund, L.; Lyngbaek, M. P.; Wewer Albrechtsen, N. J.; Schmidt-Trucksäss, A.; Hanssen, H.; Frey, W. O.; Karstoft, K.; Pedersen, B. K.; Böni-Schnetzler, M.; Donath, M. Y., GLP-1 secretion is regulated by IL-6 signalling: a randomised, placebo-controlled study. *Diabetologia* **2020**, 63, (2), 362-373.
156. Klover, P. J.; Zimmers, T. A.; Koniaris, L. G.; Mooney, R. A., Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* **2003**, 52, (11), 2784-9.
157. Rotter, V.; Nagaev, I.; Smith, U., Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* **2003**, 278, (46), 45777-84.
158. Kim, H. J.; Higashimori, T.; Park, S. Y.; Choi, H.; Dong, J.; Kim, Y. J.; Noh, H. L.; Cho, Y. R.; Cline, G.; Kim, Y. B.; Kim, J. K., Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* **2004**, 53, (4), 1060-7.
159. Carey, A. L.; Steinberg, G. R.; Macaulay, S. L.; Thomas, W. G.; Holmes, A. G.; Ramm, G.; Prelovsek, O.; Hohnen-Behrens, C.; Watt, M. J.; James, D. E.; Kemp, B. E.; Pedersen, B. K.; Febbraio, M. A., Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **2006**, 55, (10), 2688-97.
160. Glund, S.; Deshmukh, A.; Long, Y. C.; Moller, T.; Koistinen, H. A.; Caidahl, K.; Zierath, J. R.; Krook, A., Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes* **2007**, 56, (6), 1630-7.
161. Petersen, E. W.; Carey, A. L.; Sacchetti, M.; Steinberg, G. R.; Macaulay, S. L.; Febbraio, M. A.; Pedersen, B. K., Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2005**, 288, (1), E155-62.
162. Steensberg, A.; Fischer, C. P.; Keller, C.; Møller, K.; Pedersen, B. K., IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2003**, 285, (2), E433-7.
163. Nemet, D.; Eliakim, A.; Zaldivar, F.; Cooper, D. M., Effect of rhIL-6 infusion on GH-->IGF-I axis mediators in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2006**, 291, (6), R1663-8.
164. Febbraio, M. A.; Hiscock, N.; Sacchetti, M.; Fischer, C. P.; Pedersen, B. K., Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* **2004**, 53, (7), 1643-8.
165. Chowdhury, S.; Schulz, L.; Palmisano, B.; Singh, P.; Berger, J. M.; Yadav, V. K.; Mera, P.; Ellingsgaard, H.; Hidalgo, J.; Brüning, J.; Karsenty, G., Muscle-derived interleukin 6 increases exercise capacity by signaling in osteoblasts. *J Clin Invest* **2020**, 130, (6), 2888-2902.
166. Lukaszuk, B.; Bialuk, I.; Górski, J.; Zajączkiewicz, M.; Winnicka, M. M.; Chabowski, A., A single bout of exercise increases the expression of glucose but not fatty acid transporters in skeletal muscle of IL-6 KO mice. *Lipids* **2012**, 47, (8), 763-72.
167. Fielding, C. A.; McLoughlin, R. M.; McLeod, L.; Colmont, C. S.; Najdovska, M.; Grail, D.; Ernst, M.; Jones, S. A.; Topley, N.; Jenkins, B. J., IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol* **2008**, 181, (3), 2189-95.
168. Kimura, A.; Kishimoto, T., IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* **2010**, 40, (7), 1830-5.



169. Diehl, S.; Rincón, M., The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* **2002**, 39, (9), 531-6.
170. Dominitzki, S.; Fantini, M. C.; Neufert, C.; Nikolaev, A.; Galle, P. R.; Scheller, J.; Monteleone, G.; Rose-John, S.; Neurath, M. F.; Becker, C., Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol* **2007**, 179, (4), 2041-5.
171. Bettelli, E.; Korn, T.; Oukka, M.; Kuchroo, V. K., Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **2008**, 453, (7198), 1051-7.
172. Starkie, R.; Ostrowski, S. R.; Jauffred, S.; Febbraio, M.; Pedersen, B. K., Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *Faseb j* **2003**, 17, (8), 884-6.
173. Schindler, R.; Mancilla, J.; Endres, S.; Ghorbani, R.; Clark, S. C.; Dinarello, C. A., Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* **1990**, 75, (1), 40-7.
174. Eskilsson, A.; Mirrasekhian, E.; Dufour, S.; Schwaninger, M.; Engblom, D.; Blomqvist, A., Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. *J Neurosci* **2014**, 34, (48), 15957-61.
175. Bode, J. G.; Albrecht, U.; Häussinger, D.; Heinrich, P. C.; Schaper, F., Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* **2012**, 91, (6-7), 496-505.
176. Fernando, M. R.; Reyes, J. L.; Iannuzzi, J.; Leung, G.; McKay, D. M., The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One* **2014**, 9, (4), e94188.
177. Zhao, J. L.; Ma, C.; O'Connell, R. M.; Mehta, A.; DiLoreto, R.; Heath, J. R.; Baltimore, D., Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **2014**, 14, (4), 445-459.
178. Tie, R.; Li, H.; Cai, S.; Liang, Z.; Shan, W.; Wang, B.; Tan, Y.; Zheng, W.; Huang, H., Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Exp Mol Med* **2019**, 51, (10), 1-12.
179. Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S., IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* **2016**, 64, (6), 1403-15.
180. Kuhn, K. A.; Manieri, N. A.; Liu, T. C.; Stappenbeck, T. S., IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One* **2014**, 9, (12), e114195.
181. McLoughlin, R. M.; Jenkins, B. J.; Grail, D.; Williams, A. S.; Fielding, C. A.; Parker, C. R.; Ernst, M.; Topley, N.; Jones, S. A., IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, (27), 9589-94.
182. Hurst, S. M.; Wilkinson, T. S.; McLoughlin, R. M.; Jones, S.; Horiuchi, S.; Yamamoto, N.; Rose-John, S.; Fuller, G. M.; Topley, N.; Jones, S. A., Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* **2001**, 14, (6), 705-14.
183. Tournadre, A.; Pereira, B.; Dutheil, F.; Giraud, C.; Courteix, D.; Sapin, V.; Frayssac, T.; Mathieu, S.; Malochet-Guinamand, S.; Soubrier, M., Changes in body composition and metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, 8, (4), 639-646.

184. Narsale, A. A.; Carson, J. A., Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. *Curr Opin Support Palliat Care* **2014**, *8*, (4), 321-7.
185. Serrano, A. L.; Baeza-Raja, B.; Perdiguero, E.; Jardí, M.; Muñoz-Cánoves, P., Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* **2008**, *7*, (1), 33-44.
186. Kwan Tat, S.; Padrines, M.; Théoleyre, S.; Heymann, D.; Fortun, Y., IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* **2004**, *15*, (1), 49-60.
187. Johnson, R. W.; McGregor, N. E.; Brennan, H. J.; Crimeen-Irwin, B.; Poulton, I. J.; Martin, T. J.; Sims, N. A., Glycoprotein130 (Gp130)/interleukin-6 (IL-6) signalling in osteoclasts promotes bone formation in periosteal and trabecular bone. *Bone* **2015**, *81*, 343-351.
188. Bhutta, B. S.; Alghoula, F.; Berim, I., Hypoxia. In *StatPearls*, StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2023.
189. Mallat, J.; Rahman, N.; Hamed, F.; Hernandez, G.; Fischer, M. O., Pathophysiology, mechanisms, and managements of tissue hypoxia. *Anaesth Crit Care Pain Med* **2022**, *41*, (4), 101087.
190. Semenza, G. L., Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **2012**, *148*, (3), 399-408.
191. Angus, D. C., Oxygen Therapy for the Critically Ill. *N Engl J Med* **2020**, *382*, (11), 1054-1056.
192. Helmerhorst, H. J.; Roos-Blom, M. J.; van Westerloo, D. J.; de Jonge, E., Association Between Arterial Hyperoxia and Outcome in Subsets of Critical Illness: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression of Cohort Studies. *Crit Care Med* **2015**, *43*, (7), 1508-19.
193. Damiani, E.; Donati, A.; Girardis, M., Oxygen in the critically ill: friend or foe? *Curr Opin Anaesthesiol* **2018**, *31*, (2), 129-135.
194. Ariyaratnam, P.; Loubani, M.; Bennett, R.; Griffin, S.; Chaudhry, M. A.; Cowen, M. E.; Guvendik, L.; Cale, A. R. J.; Morice, A. H., Hyperoxic Vasoconstriction of Human Pulmonary Arteries: A Novel Insight into Acute Ventricular Septal Defects. *ISRN Cardiology* **2013**, 2013, 685735.
195. Brueckl, C.; Kaestle, S.; Kerem, A.; Habazettl, H.; Krombach, F.; Kuppe, H.; Kuebler, W. M., Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**, *34*, (4), 453-63.
196. Johnson, N. J.; Dodampahala, K.; Rosselot, B.; Perman, S. M.; Mikkelsen, M. E.; Goyal, M.; Gaieski, D. F.; Grossestreuer, A. V., The Association Between Arterial Oxygen Tension and Neurological Outcome After Cardiac Arrest. *Ther Hypothermia Temp Manag* **2017**, *7*, (1), 36-41.
197. Shah, J., Hyperbaric oxygen therapy. *J Am Col Certif Wound Spec* **2010**, *2*, (1), 9-13.
198. Pelaia, C.; Bruni, A.; Garofalo, E.; Rovida, S.; Arrighi, E.; Cammarota, G.; Navalesi, P.; Pelaia, G.; Longhini, F., Oxygenation strategies during flexible bronchoscopy: a review of the literature. *Respiratory Research* **2021**, *22*, (1), 253.
199. Balestra, C.; Kot, J., Oxygen: A Stimulus, Not "Only" a Drug. *Medicina (Kaunas)* **2021**, *57*, (11).
200. Fu, Q.; Duan, R.; Sun, Y.; Li, Q., Hyperbaric oxygen therapy for healthy aging: From mechanisms to therapeutics. *Redox Biology* **2022**, *53*, 102352.

201. Balestra, C.; Lambrechts, K.; Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Levenez, M.; Germonpre, P.; Virgili, F.; Bosco, G.; Lafere, P., Hypoxic and Hyperoxic Breathing as a Complement to Low-Intensity Physical Exercise Programs: A Proof-of-Principle Study. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, (17).
202. Khalife, M.; Ben Aziz, M.; Balestra, C.; Valsamis, J.; Sosnowski, M., Physiological and Clinical Impact of Repeated Inhaled Oxygen Variation on Erythropoietin Levels in Patients After Surgery. *Front Physiol* **2021**, *12*, 744074.
203. Donati, A.; Damiani, E.; Zuccari, S.; Domizi, R.; Scorcella, C.; Girardis, M.; Giulietti, A.; Vignini, A.; Adrario, E.; Romano, R.; Mazzanti, L.; Pelaia, P.; Singer, M., Effects of short-term hyperoxia on erythropoietin levels and microcirculation in critically ill patients: a prospective observational pilot study. *BMC Anesthesiology* **2017**, *17*, (1), 49.
204. Rocco, M.; D'Itri, L.; De Bels, D.; Corazza, F.; Balestra, C., The "normobaric oxygen paradox": a new tool for the anesthetist? *Minerva Anestesiol* **2014**, *80*, (3), 366-72.
205. Hadanny, A.; Efrati, S., The Hyperoxic-Hypoxic Paradox. *Biomolecules* **2020**, *10*, (6).
206. Corrado, C.; Fontana, S., Hypoxia and HIF Signaling: One Axis with Divergent Effects. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, (16), 5611.
207. Greer, S. N.; Metcalf, J. L.; Wang, Y.; Ohh, M., The updated biology of hypoxia-inducible factor. *Embo j* **2012**, *31*, (11), 2448-60.
208. Shvetsova, A. N.; Mennerich, D.; Kerätär, J. M.; Hiltunen, J. K.; Kietzmann, T., Non-electron transfer chain mitochondrial defects differently regulate HIF-1 $\alpha$  degradation and transcription. *Redox Biol* **2017**, *12*, 1052-1061.
209. Leveque, C.; Mrakic-Sposta, S.; Lafère, P.; Vezzoli, A.; Germonpré, P.; Beer, A.; Mievis, S.; Virgili, F.; Lambrechts, K.; Theunissen, S.; Guerrero, F.; Balestra, C., Oxidative Stress Response's Kinetics after 60 Minutes at Different (30% or 100%) Normobaric Hyperoxia Exposures. *Int J Mol Sci* **2022**, *24*, (1).
210. Lopez-Barneo, J.; Simon, M. C., Cellular adaptation to oxygen deficiency beyond the Nobel award. *Nat Commun* **2020**, *11*, (1), 607.
211. de Jonge, E.; Peelen, L.; Keijzers, P. J.; Joore, H.; de Lange, D.; van der Voort, P. H.; Bosman, R. J.; de Waal, R. A.; Wesselink, R.; de Keizer, N. F., Association between administered oxygen, arterial partial oxygen pressure and mortality in mechanically ventilated intensive care unit patients. *Crit Care* **2008**, *12*, (6), R156.
212. Wingelaar, T. T.; van Ooij, P. A. M.; van Hulst, R. A., Oxygen Toxicity and Special Operations Forces Diving: Hidden and Dangerous. *Front Psychol* **2017**, *8*, 1263.
213. Arieli, R.; Aviner, B., Acclimatization and Deacclimatization to Oxygen: Determining Exposure Limits to Avoid CNS O<sub>2</sub> Toxicity in Active Diving. *Front Physiol* **2020**, *11*, 1105.
214. Aviner, B.; Arieli, R.; Yalov, A., Power Equation for Predicting the Risk of Central Nervous System Oxygen Toxicity at Rest. *Front Physiol* **2020**, *11*, 1007.
215. De Bels, D.; Tillmans, F.; Corazza, F.; Bizzarri, M.; Germonpre, P.; Radermacher, P.; Orman, K. G.; Balestra, C., Hyperoxia Alters Ultrastructure and Induces Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Biomolecules* **2020**, *10*, (2), 282.
216. Lafere, P.; Schubert, T.; De Bels, D.; Germonpre, P.; Balestra, C., Can the normobaric oxygen paradox (NOP) increase reticulocyte count after traumatic hip surgery? *Journal of clinical anesthesia* **2013**, *25*, (2), 129-34.

217. World Medical, A., World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, 310, (20), 2191-4.
218. Leveque, C.; Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Gussoni, M.; Levenez, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; Balestra, C., Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different Levels (10% or 15%) of Normobaric Hypoxia Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, (12), 10188.
219. Leveque, C.; Mrakic Sposta, S.; Theunissen, S.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Vezzoli, A.; Bosco, G.; Lévénéz, M.; Lafère, P.; Guerrero, F.; Balestra, C., Oxidative Stress Response Kinetics after 60 Minutes at Different (1.4 ATA and 2.5 ATA) Hyperbaric Hyperoxia Exposures. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, (15), 12361.
220. Balestra, C.; Arya, A. K.; Leveque, C.; Virgili, F.; Germonpré, P.; Lambrechts, K.; Lafère, P.; Thom, S. R., Varying Oxygen Partial Pressure Elicits Blood-Borne Microparticles Expressing Different Cell-Specific Proteins&mdash;Toward a Targeted Use of Oxygen? *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, (14), 7888.
221. Bosco, G.; Paganini, M.; Giacon, T. A.; Oppio, A.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Moro, T.; Paoli, A.; Zanotti, F.; Zavan, B.; Balestra, C.; Mrakic-Sposta, S., Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int J Environ Res Public Health* **2021**, 18, (18).
222. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; D'Alessandro, F.; Paganini, M.; Dellanoce, C.; Cialoni, D.; Bosco, G., Change in Oxidative Stress Biomarkers During 30 Days in Saturation Dive: A Pilot Study. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, 17, (19).
223. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; Scricciolo, A.; Elli, L., Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin Transl Gastroenterol* **2018**, 9, (6), 157.
224. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Rizzato, A.; Della Noce, C.; Malacrida, S.; Montorsi, M.; Paganini, M.; Cancellara, P.; Bosco, G., Oxidative stress assessment in breath-hold diving. *Eur J Appl Physiol* **2019**, 119, (11-12), 2449-2456.
225. Bosco, G.; Rizzato, A.; Quartesan, S.; Camporesi, E.; Mrakic-Sposta, S.; Moretti, S.; Balestra, C.; Rubini, A., Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water. *Undersea Hyperb Med* **2018**, 45, (2), 191-198.
226. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A., A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, 2014, 306179.
227. Menzel, A.; Samouda, H.; Dohet, F.; Loap, S.; Ellulu, M. S.; Bohn, T., Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice-Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants (Basel)* **2021**, 10, (3).
228. Mrakic-Sposta, S.; Gussoni, M.; Montorsi, M.; Porcelli, S.; Vezzoli, A., Assessment of a standardized ROS production profile in humans by electron paramagnetic resonance. *Oxid Med Cell Longev* **2012**, 2012, 973927.

229. Dellanoce, C.; Cozzi, L.; Zuddas, S.; Pratali, L.; Accinni, R., Determination of different forms of aminothiols in red blood cells without washing erythrocytes. *Biomedical Chromatography* **2014**, 28, (3), 327-331.
230. Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Mrakic-Sposta, S.; Montorsi, M.; Moretti, S.; Tonini, A.; Pratali, L.; Accinni, R., Oxidative Stress Assessment in Response to Ultraendurance Exercise: Thiols Redox Status and ROS Production according to Duration of a Competitive Race. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, 2016, 6439037.
231. Ciccone, M. M.; Bilianou, E.; Balbarini, A.; Gesualdo, M.; Ghiadoni, L.; Metra, M.; Palmiero, P.; Pedrinelli, R.; Salvetti, M.; Scicchitano, P.; Zito, A.; Novo, S.; Mattioli, A. V., Task force on: 'Early markers of atherosclerosis: influence of age and sex'. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **2013**, 14, (10), 757-66.
232. Wu, J.; Chen, Y.; Luo, Y., Evaluation of the visual analog score (VAS) to assess acute mountain sickness (AMS) in a hypobaric chamber. *PLoS One* **2014**, 9, (11), e113376.
233. Bailey, D. M.; Ainslie, P. N.; Jackson, S. K.; Richardson, R. S.; Ghatei, M., Evidence against redox regulation of energy homeostasis in humans at high altitude. *Clin Sci (Lond)* **2004**, 107, (6), 589-600.
234. Bailey, D. M.; Bain, A. R.; Hoiland, R. L.; Barak, O. F.; Drvis, I.; Hirtz, C.; Lehmann, S.; Marchi, N.; Janigro, D.; MacLeod, D. B.; Ainslie, P. N.; Dujic, Z., Hypoxemia increases blood-brain barrier permeability during extreme apnea in humans. *J Cereb Blood Flow Metab* **2022**, 42, (6), 1120-1135.
235. Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G., Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **2000**, 908, 244-54.
236. Franceschi, C.; Campisi, J., Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **2014**, 69 Suppl 1, S4-9.
237. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D. W.; Fasano, A.; Miller, G. W.; Miller, A. H.; Mantovani, A.; Weyand, C. M.; Barzilai, N.; Goronzy, J. J.; Rando, T. A.; Effros, R. B.; Lucia, A.; Kleinstreuer, N.; Slavich, G. M., Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature Medicine* **2019**, 25, (12), 1822-1832.
238. Akhigbe, R.; Ajayi, A., The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids in Health and Disease* **2021**, 20, (1).
239. Checa, J.; Aran, J. M., <p>Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes</p>. *Journal of Inflammation Research* **2020**, Volume 13, 1057-1073.
240. Khan, S. A.; Nanduri, J.; Yuan, G.; Kinsman, B.; Kumar, G. K.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B.; Prabhakar, N. R., NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial complex I inhibition: relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid Redox Signal* **2011**, 14, (4), 533-42.
241. Kim, H.; Scimia, Maria C.; Wilkinson, D.; Trelles, Ramon D.; Wood, Malcolm R.; Bowtell, D.; Dillin, A.; Mercola, M.; Ronai, Z. ev A., Fine-Tuning of Drp1/Fis1 Availability by AKAP121/Siah2 Regulates Mitochondrial Adaptation to Hypoxia. *Molecular Cell* **2011**, 44, (4), 532-544.
242. Liu, X.; Hajnóczky, G., Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia–reoxygenation stress. *Cell Death & Differentiation* **2011**, 18, (10), 1561-1572.

243. Fuhrmann, D. C.; Brüne, B., Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol* **2017**, *12*, 208-215.
244. Fridovich, I., SUPEROXIDE RADICAL AND SUPEROXIDE DISMUTASES. *Annual Review of Biochemistry* **1995**, *64*, (1), 97-112.
245. Mrakic-Spota, S.; Gussoni, M.; Marzorati, M.; Porcelli, S.; Bosco, G.; Balestra, C.; Montorsi, M.; Lafortuna, C.; Vezzoli, A., The "ON-OFF" Switching Response of Reactive Oxygen Species in Acute Normobaric Hypoxia: Preliminary Outcome. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, (4).
246. Ribon, A.; Pialoux, V.; Saugy, J. J.; Rupp, T.; Faiss, R.; Debevec, T.; Millet, G. P., Exposure to hypobaric hypoxia results in higher oxidative stress compared to normobaric hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **2016**, *223*, 23-7.
247. Radi, R., Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, (23), 5839-5848.
248. Schildknecht, S.; Ullrich, V., Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys* **2009**, *484*, (2), 183-9.
249. Fujii, J.; Homma, T.; Osaki, T., Superoxide Radicals in the Execution of Cell Death. *Antioxidants (Basel)* **2022**, *11*, (3).
250. Jiménez-Banzo, A.; Sagristà, M. L.; Mora, M.; Nonell, S., Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **2008**, *44*, (11), 1926-34.
251. Redmond, R. W.; Kochevar, I. E., Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **2006**, *82*, (5), 1178-86.
252. Halliwell, B., How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* **1990**, *9*, (1), 1-32.
253. Vermot, A.; Petit-Härtlein, I.; Smith, S. M. E.; Fieschi, F., NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants* **2021**, *10*, (6), 890.
254. Magalhães, J.; Ascensão, A.; Viscor, G.; Soares, J.; Oliveira, J.; Marques, F.; Duarte, J., Oxidative stress in humans during and after 4 hours of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m. *Aviat Space Environ Med* **2004**, *75*, (1), 16-22.
255. Coppel, J.; Hennis, P.; Gilbert-Kawai, E.; Grocott, M. P., The physiological effects of hypobaric hypoxia versus normobaric hypoxia: a systematic review of crossover trials. *Extrem Physiol Med* **2015**, *4*, 2.
256. Kuzkaya, N.; Weissmann, N.; Harrison, D. G.; Dikalov, S., Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical Pharmacology* **2005**, *70*, (3), 343-354.
257. Gu, X.; El-Remessy, A. B.; Brooks, S. E.; Al-Shabrawey, M.; Tsai, N.-T.; Caldwell, R. B., Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2003**, *285*, (3), C546-C554.
258. Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P., Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78*, (11), 6858-6862.
259. Maxwell, S. R.; Thomason, H.; Sandler, D.; Leguen, C.; Baxter, M. A.; Thorpe, G. H.; Jones, A. F.; Barnett, A. H., Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-

- dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* **1997**, *27*, (6), 484-90.
260. Waring, W. S.; Webb, D. J.; Maxwell, S. R., Systemic uric acid administration increases serum antioxidant capacity in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* **2001**, *38*, (3), 365-71.
261. WARING, W. S.; CONVERY, A.; MISHRA, V.; SHENKIN, A.; WEBB, D. J.; MAXWELL, S. R. J., Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clinical Science* **2003**, *105*, (4), 425-430.
262. de Wolde, S. D.; Hulskes, R. H.; de Jonge, S. W.; Hollmann, M. W.; van Hulst, R. A.; Weenink, R. P.; Kox, M., The Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Markers of Oxidative Stress and the Immune Response in Healthy Volunteers. *Front Physiol* **2022**, *13*, 826163.
263. Maroon, J. C., The effect of hyperbaric oxygen therapy on cognition, performance, proteomics, and telomere length—The difference between zero and one: A case report. *Frontiers in Neurology* **2022**, *13*.
264. Zhilyaev, S. Y.; Moskvina, A. N.; Platonova, T. F.; Gutsaeva, D. R.; Churilina, I. V.; Demchenko, I. T., Hyperoxic vasoconstriction in the brain is mediated by inactivation of nitric oxide by superoxide anions. *Neurosci Behav Physiol* **2003**, *33*, (8), 783-7.
265. Muskat, J. C.; Babbs, C. F.; Goergen, C. J.; Rayz, V. L., Transport of nitrite from large arteries modulates regional blood flow during stress and exercise. *Front Cardiovasc Med* **2023**, *10*, 1146717.
266. Eventoff, W.; Tanaka, N.; Rossmann, M. G., Crystalline bovine liver catalase. *Journal of Molecular Biology* **1976**, *103*, (4), 799-801.
267. Fita, I.; Silva, A.; Murthy, M.; Rossmann, M., The refined structure of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallographica Section B-structural Science - ACTA CRYSTALLOGR B-STRUCT SCI* **1986**, *42*, 497-515.
268. Benedetti, S.; Lamorgese, A.; Piersantelli, M.; Pagliarini, S.; Benvenuti, F.; Canestrari, F., Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clinical Biochemistry* **2004**, *37*, (4), 312-317.
269. Eken, A.; Aydin, A.; Sayal, A.; Ustündağ, A.; Duydu, Y.; Dündar, K., The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans. *Clin Biochem* **2005**, *38*, (12), 1133-7.
270. Ballinger, C.; Mendis-Handagama, C.; Kalmar, J.; Arnold, R.; Kinkade, J. J., Changes in the localization of catalase during differentiation of neutrophilic granulocytes. *Blood* **1994**, *83*, (9), 2654-2668.
271. Sureda, A.; Ferrer, M. D.; Tauler, P.; Maestre, I.; Aguiló, A.; Córdova, A.; Tur, J. A.; Roche, E.; Pons, A., Intense physical activity enhances neutrophil antioxidant enzyme gene expression. Immunocytochemistry evidence for catalase secretion. *Free Radic Res* **2007**, *41*, (8), 874-83.
272. Chen, C.; He, M.; Li, X.; Yu, L.; Liu, Y.; Yang, Y.; Li, L.; Jia, J.; Li, B., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DEM-Promoted Maft Promoter Demethylation Drives Nrf2/ARE Activation in Zebrafish. *Life* **2022**, *12*, (9), 1436.
273. Semenza, G. L., HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **2000**, *88*, (4), 1474-80.
274. Cavadas, M. A. S.; Mesnieres, M.; Crifo, B.; Manresa, M. C.; Selfridge, A. C.; Scholz, C. C.; Cummins, E. P.; Cheong, A.; Taylor, C. T., REST mediates resolution of HIF-

- dependent gene expression in prolonged hypoxia. *Scientific Reports* **2015**, 5, (1), 17851.
275. Cavadas, M. A. S.; Mesnieres, M.; Crifo, B.; Manresa, M. C.; Selfridge, A. C.; Keogh, C. E.; Fabian, Z.; Scholz, C. C.; Nolan, K. A.; Rocha, L. M. A.; Tambuwala, M. M.; Brown, S.; Wdowicz, A.; Corbett, D.; Murphy, K. J.; Godson, C.; Cummins, E. P.; Taylor, C. T.; Cheong, A., REST is a hypoxia-responsive transcriptional repressor. *Scientific Reports* **2016**, 6, (1), 31355.
276. De Bels, D.; Corazza, F.; Germonpre, P.; Balestra, C., The normobaric oxygen paradox: a novel way to administer oxygen as an adjuvant treatment for cancer? *Med Hypotheses* **2010**, 76, (4), 467-70.
277. Basang, Z.; Zhang, S.; Yang, L.; Quzong, D.; Li, Y.; Ma, Y.; Hao, M.; Pu, W.; Liu, X.; Xie, H.; Liang, M.; Wang, J.; Danzeng, Q., Correlation of DNA methylation patterns to the phenotypic features of Tibetan elite alpinists in extreme hypoxia. *J Genet Genomics* **2021**.
278. Wilson, J. W.; Shakir, D.; Batie, M.; Frost, M.; Rocha, S., Oxygen-sensing mechanisms in cells. *The FEBS Journal* **2020**, 287, (18), 3888-3906.
279. Schaefer, E.; Wu, W.; Mark, C.; Yang, A.; Digiacomio, E.; Carlton-Smith, C.; Salloum, S.; Brisac, C.; Lin, W.; Corey, K. E.; Chung, R. T., Intermittent hypoxia is a proinflammatory stimulus resulting in IL-6 expression and M1 macrophage polarization. *Hepatology Communications* **2017**, 1, (4), 326-337.
280. Peng, Y.; Yang, Q.; Gao, S.; Liu, Z.; Kong, W.; Bian, X.; Li, Z.; Ye, J., IL-6 protects cardiomyocytes from oxidative stress at the early stage of LPS-induced sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2022**, 603, 144-152.
281. Wang, L.; Yang, S.; Yan, L.; Wei, H.; Wang, J.; Yu, S.; Kong, A. T.; Zhang, Y., Hypoxia preconditioning promotes endurance exercise capacity of mice by activating skeletal muscle Nrf2. *J Appl Physiol (1985)* **2019**, 127, (5), 1267-1277.
282. Kobayashi, E. H.; Suzuki, T.; Funayama, R.; Nagashima, T.; Hayashi, M.; Sekine, H.; Tanaka, N.; Moriguchi, T.; Motohashi, H.; Nakayama, K.; Yamamoto, M., Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature Communications* **2016**, 7, (1), 11624.
283. Gao, W.; Guo, L.; Yang, Y.; Wang, Y.; Xia, S.; Gong, H.; Zhang, B. K.; Yan, M., Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- $\kappa$ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front Cell Dev Biol* **2021**, 9, 809952.
284. de Paula Martins, R.; Ghisoni, K.; Lim, C. K.; Aguiar, A. S.; Guillemin, G. J.; Latini, A., Neopterin preconditioning prevents inflammasome activation in mammalian astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, 115, 371-382.



**Titre :** Effet des variations de pressions partielles d'oxygène sur les réactions cellulaires chez le sujet sain.

**Mots clés :** Oxygène, stress oxydant, inflammation, paradoxe de l'oxygène normobare (NOP), réponses cellulaires

**Résumé :**

La compréhension de l'impact de l'oxygène sur les organismes révèle des réponses cellulaires complexes. Des études exposant des sujets sains pendant 1 heure à diverses pressions partielles d'oxygène révèlent des différences quantitatives et cinétiques significatives des réponses cellulaires. En hypoxie normobare, un pic de radicaux libres d'oxygène est observé 30 minutes après l'exposition, sans activation immédiate de réponses antioxydantes. L'interleukine-6 augmente progressivement, atteignant un pic à 8h, reflétant une inflammation évolutive.

En hyperoxie normobare, la production de radicaux libres d'oxygène augmente plus tardivement, avec une inhibition de l'interleukine 6 observée 2 heures après

exposition, suivie d'un pic à 24 heures et un retour à la ligne de base après 48 heures.

En hyperoxie hyperbare, une élévation rapide et soutenue des radicaux libres d'oxygène est observée jusqu'à 48 heures, sans distinction significative entre les expositions à 140% et 250% de FiO<sub>2</sub>. La catalase est rapidement stimulée et maintenue au-delà de 48 heures, démontrant une activation des mécanismes de protection contre l'oxydation. Cette complexité souligne l'importance d'une exploration approfondie des mécanismes cellulaires et de la biogenèse moléculaire intracellulaire, offrant des perspectives prometteuses pour des avancées dans le domaine de la physiologie.

**Title :** Effect of variations in oxygen partial pressures on cellular reactions in healthy subjects.

**Keywords :** Oxygen, oxidative stress, inflammation, normobaric oxygen paradox (NOP), cellular responses.

**Abstract :** Understanding the impact of oxygen on organisms reveals complex cellular responses. Studies exposing healthy subjects during one hour, to various partial pressures of oxygen reveal significant quantitative and kinetic differences in cellular responses. In normobaric hypoxia, a peak of oxygen free radicals is observed 30 minutes after exposure, without immediate activation of antioxidant responses. Interleukin-6 gradually increases, reaching a peak at 8 hours, reflecting evolving inflammation. In normobaric hyperoxia, the production of oxygen free radicals increases later, with inhibition of interleukin-6 observed 2 hours

after exposure, followed by a peak at 24 hours and a return to baseline after 48 hours.

In hyperbaric hyperoxia, a rapid and sustained elevation of oxygen free radicals is observed for up to 48 hours, with no significant distinction between exposures to 140% and 250% FiO<sub>2</sub>. Catalase is rapidly stimulated and maintained beyond 48 hours, demonstrating activation of oxidation protection mechanisms. This complexity underscores the importance of thorough exploration of cellular mechanisms and intracellular molecular biogenesis, offering promising perspectives for advances in the field of physiology.