VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2011 - Thèse n°

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CHIEN DE CROSS CANIN

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 5 décembre 2011
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Marion TISSIER
Née le 19 juillet 1986
à GRENOBLE

ENSEIGNANTS CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP (1/2)

NOM	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
ALOGNINOUWA	Théodore	Professeur 1ere cl	Pathologie du bétail
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
ARCANGIOLI	Marie-Anne	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
ARTOIS	Marc	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BECKER	Claire	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
BELLI	Patrick	Maître de conférences associé	Pathologie morphologique et clinique
BELLUCO	Sara	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences cl normale	Equine
BENOIT	Etienne	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BERNY	Philippe	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
BOULOCHER	Caroline	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
BOURDOISEAU	Gilles	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
BRUYERE	Pierre	Maître de conférences Contractuel	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BUFF	Samuel	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
BURONFOSSE	Thierry	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
CACHON	Thibaut	Maître de conférences Contractuel	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CADORE	Jean-Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
CAROZZO	Claude	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
CHABANNE	Luc	Professeur 1ere cl	Pathologie médicale des animaux de compagnie
CHALVET-MONFRAY	Karine	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
COMMUN	Loic	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
DEMONT	Pierre	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
DESJARDINS PESSON	Isabelle	Maître de conférences Contractuel	Equine
DJELOUADJI	Zorée	Maître de conférences stagiaire	Santé Publique et Vétérinaire
ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
FAU	Didier	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
FOURNEL	Corinne	Professeur 1ere cl	Pathologie morphologique et clinique
FRANCK	Michel	Professeur 1ere cl	Gestion des élevages
FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences cl normale	Pathologie du bétail
GANGL	Monika	Maître de conférences Contractuel	Equine
GARNIER	François	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
GENEVOIS	Jean-Pierre	Professeur cl ex	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur 2eme cl	Biologie Fonctionnelle
GONTHIER	Alain	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GRAIN	Françoise	Professeur 2eme cl	Gestion des élevages
GRANCHER	Denis	Maître de conférences hors cl	Gestion des élevages
GREZEL	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
GUERIN	Pierre	Professeur 2eme cl	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
HUGONNARD	Marine	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie

ENSEIGNANTS CAMPUS VETERINAIRE DE VETAGRO SUP (2/2)

	Prénom	Grade	Unité Pédagogique
JUNOT	Stéphane	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
KECK	Gérard	Professeur 1ere cl	Biologie fonctionnelle
KODJO	Angeli	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LACHERETZ	Antoine	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
LAMBERT	Véronique	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
LEGRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANCPOHL	AnneCécile	Maître de conférences cl normale	Biotechnologies et pathologie de la reproduction
LEPAGE	Olivier	Professeur 1ere cl	Equine
LOUZIER	Vanessa	Maître de conférences cl normale	Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	Maître de conférences hors cl	Pathologie morphologique et clinique
MIALET	Sylvie	Inspecteur de la santé publique vétérinaire (ISPV) faisant fonctio n de MC	Santé Publique et Vétérinaire
MOUNIER	Luc	Maître de conférences cl normale	Gestion des élevages
PEPIN	Michel	Professeur 1ere cl	Santé Publique et Vétérinaire
PIN	Didier	Maître de conférences cl normale	Pathologie morphologique et clinique
PONCE	Frédérique	Maître de conférences cl normale	Pathologie médicale des animaux de compagnie
PORTIER	Karine	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
PROUILLAC	Caroline	Maître de conférences cl normale	Biologie fonctionnelle
REMY	Denise	Professeur 2eme cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
ROGER	Thierry	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SABATIER	Philippe	Professeur 2eme cl	Biologie fonctionnelle
SAWAYA	Serge	Maître de conférences cl normale	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
SERGENTET	Delphine	Maître de conférences cl normale	Santé Publique et Vétérinaire
THIEBAULT	JeanJacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUXWATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractu el	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

Remerciements

A Monsieur le Professeur Claude GHARIB
De la Faculté de Médecine de Lyon,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Qu'il reçoive ici l'expression de nos hommages très respectueux.

A Monsieur le Professeur Jean-Jacques THIEBAULT
De VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon,
Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail de thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de nos sincères remerciements,
Et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc CADORE
De VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon
Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail,
Qu'il trouve ici l'expression de nos sincères remerciements,
Et de notre profond respect.

A Madame Annabelle KERZUSAN
Pour son soutien et son aide au cours de l'étude de terrain

A l'ensemble des concurrents du Trophée Sud Bourgogne
Pour leur participation à l'étude et leur sympathie

A mon père,

Encordé mais libre. A ses montagnes, reconnaissante, infiniment, pour le bien-être intérieur que ma jeunesse a retiré de leur sévère école.

TABLE DES MATIERES

Liste des annexes……..……..17

Liste des illustrations……..17

Liste des tableaux……18

Liste des abréviations……..…19

Introduction……..…21

Première partie : étude bibliographique

I.Le cross canin et ses disciplines apparentées, une activité récente en expansion.....22

A. Une discipline née des sports de traine 22
1. L'Alaska, berceau des sports de traine 22
2. Historique de la discipline en France..... 22

B. Les différentes pratiques dérivées des sports de traine 23
1. Les pratiques sur neige 23
a. Le skijöring 23
b. Le ski-pulka..... 24
c. Le traineau à chiens..... 25
2. Les pratiques sur terre..... 25
a. Le canicross ou cross canin au sens strict 25
b. Le kart 26
c. Le bike-jöring ou vélocross ou caniVTT..... 27
d. Le roller ou patinette à chiens ou scooter ou cani-trottinette..... 28

C. Aspects réglementaires du sport canin 29
1. Les institutions..... 29
2. Profil du chien participant au sport de traine sur terre 30
a. Les races typées « chasse » 30
b. Les races Nordiques et apparentées..... 31
3. Matériel utilisé..... 32
a. Le harnais 32
b. Les longes..... 33
4. L'age du chien participant 34
5. Type d'effort..... 34

II.Le stress oxydant.....35

A.Définition du stress oxydant.....35

1. Rappels concernant les mécanismes d'oxydoréduction..... 35
2. Les espèces réactives et les radicaux libres de l'oxygène..... 35
a. Définition des radicaux libres..... 35
b. Notion de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène 36
(1) Les espèces radicalaires ou radicaux libres dérivés de l'oxygène 37
(a) Le radical libre superoxyde $O_2^{\bullet-}$ 37
(b) Le radical hydroperoxyle $HO_2^{\bullet}$..... 39
(c) Le radical hydroxyl $OH^{\bullet}$..... 39
(d) Le radical peroxyl $RO_2^{\bullet}$..... 39
(e) Le radical carbonate $CO_3^{\bullet-}$..... 40
(f) Le radical alkoxyl $RO^{\bullet}$..... 40
(2) Les espèces réactives de l'oxygène non radicalaires 40
(a) Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 40
(b) L'oxygène singulet $'O_2$ ou $^1O_2$ 41
(c) L'hydroperoxyde lipidique LOOH..... 41
(d) L'hypochlorite ^-OCl..... 41

(e) L'ozone O_3 42
(3) Autres composants 42
(a) L'oxyde nitrique $NO^{\bullet}$ 42
(b) Le dioxyde d'azote $NO_2^{\bullet}$ 43
(c) Le peroxynitrite $ONOO^-$ 43
(4) Commentaires 43
3. La notion de stress oxydant 43

B. Les origines du stress oxydant 44

1. Généralités 44
2. Les sources de production d'espèces réactives de l'oxygène au sein des organismes aérobies 44
a. La chaine respiratoire mitochondriale 44
b. Transporteurs d'électrons, métaux de transition et production d'espèces réactives de l'oxygène 46
(1) Les cofacteurs flaviniques ; FAD et FMN 46
(2) Le coenzyme Q ou ubiquinone 46
(3) Les métaux de transition 47
c. Les NAPDH oxydases 48
d. La xanthine oxidoréductase 48
e. Les oxydases des peroxysomes 49
f. Les cytochromes P450 49
g. Les cyclooxygénases 50
h. La myélopéroxydase 50
i. Les monoxyde d'azote synthétases (NOS) 50
j. Les sources exogènes d'espèces réactives de l'oxygène 51

C. Systèmes cellulaires de défense antioxydants 51

1.Les mécanismes antioxydants 51

2.Les acteurs enzymatiques de la défense anti-oxydante 52

a. Mécanisme global de la destruction des ions superoxyde et des peroxydes 52
b. La superoxyde dismutase 52
c. Les glutathion peroxydases 53
d. Les glutathion S-transférases 53
e. Les catalases 53
f. Les thiorédoxines 54
g. La glutarédoxine 54
h. Les péroxyrédoxines 54
i. La hème-oxygénase 54
j. La paraoxonase-1 54

3.Les acteurs non enzymatiques de la défense antioxydante 55

a. Composés antioxydants issus de l'alimentation 55
(1) Les antioxydants liposolubles 55
(a) Les vitamines E ou tocophérols 55
(b) Les vitamines Q ou ubiquinones 57
(c) Les caroténoïdes 57
(d) La taurine 58
(2) Les antioxydants hydrosolubles 58
(a) Les vitamines C ou ascorbates 58
(b) Les polyphénols 59
(c) Les phytates 59
(3) Oligo-éléments minéraux cofacteurs enzymatiques 59
b. Les chélateurs endogènes de métaux de transition 61
c. Le système glutathion : glutathion réduit (GHS) et glutathion oxydé (GSSG) 61
d. Les autres thiols 62
e. L'acide urique 63
f. La bilirubine 63
g. Les aminostéroïdes 63

4.Régulation des systèmes de défense....64

D.Conséquences du stress oxydant....64

1.A l'échelle cellulaire....64

2.A l'échelle moléculaire....65

a. Rôle délétère des espèces réactives de l'oxygène....65
(1) Altération des lipides insaturés membranaires....66
(2) Altération des protéines....67
(3) Altération de l'ADN....69
(4) Effets sur les polysaccharides....70
b. Aspect bénéfique des espèces réactives de l'oxygène....70

3. Conséquences pathologiques du stress oxydant chez le chien – les maladies qui intègrent une composante radicalaire....71

a. Lésions de reperfusion....71
b. Stress oxydant et cancérogénèse....72
c. Les affections neurologiques dégénératives....73
d. Stress oxydant et affections oculaires....73
e. Stress oxydant et insuffisance rénale chronique....74
f. Stress oxydant et diabète....74
g. La théorie radicalaire du vieillissement....74

E.Caractérisation du stress oxydant....75

1.Les difficultés inhérentes à l'exploration du stress oxydant....75

2.Voies d'exploration du stress oxydant....76

a. Principes de base concernant les techniques de dosage....76
b. Caractérisation du statut pro-oxydant....77
(1) Méthodes directes....77
(a) Détection des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE)....77
(b) La chimioluminescence....78
(2) Méthodes indirectes....78
(a) Les méthodes spectroscopiques....78
(b) Mesure de la plasticité membrannaire érythrocytaire par résonance paramagnétique électronique (RPE)....78
(c) Mesure des alcanes expirés....79
(d) Teneurs plasmatique et urinaire en aldéhyde dimalonique (MDA)....79
(e) Quantification de la production d'hydroperoxydes lipidiques....81
(f) Détection des isosprostanes....82
(g) Détection des carbonyles protéiques....82
(h) Teneurs urinaire et tissulaire en 8-hydroxydéoxyguanosine....82
(i) La teneur en monoxyde de carbone (CO)....82
c. Caractérisation du statut antioxydant....83
(1) Capacités antioxydantes globales de l'organisme....83
(a) Pouvoir antioxydant global du plasma....83
(b) Mesure du potentiel de capture du radical peroxyl....83
(c) Mesure de la capacité antioxydante par voltammétrie cyclique....84
(2) Les antioxydants cellulaires et circulants....84
(a) Vitaminémie E....84
(b) Vitaminémie C....84
(c) L'activité catalase....85
(d) Le dosage du glutathion et la mesure du rapport GSH/GSSG....85

3.Perspectives et limites des techniques de laboratoire....85

F.Lutte contre le stress oxydant....86

1. Prévention du stress oxydant....86
a. Prévention nutritionnelle du stress oxydant 86
(1) Les bénéfices d'une supplémentation nutritionnelle antioxydante 86
(2) Les antioxydants nutritionnels 87
(3) Limites de l'apport nutritionnel en antioxydants 89
(4) La nécessité d'une stratégie nutritionnelle antioxydante raisonnée 90
b. Prévention médicale du stress oxydant 91

2. Perspectives concernant les antioxydants 91

III. Application à l'effort....92

A. Rappels de physiologie de l'effort 92
1. La définition de « l'exercice » 92
2. L'énergie nécessaire au travail musculaire 92
a. Les différents types de fibres musculaires 92
b. Substrats utilisés chez le chien au cours de l'exercice 93
(1) Les glucides 93
(2) Les protéines 93
(3) Les lipides 93
c. Les voies de production d'énergie 94
3. Comparaison de différents types d'effort 96
a. Le sprint 96
b. La course d'endurance 97
4. Adaptation de la fourniture en oxygène au cours de l'effort 97
a. Consommation de l'oxygène par l'organisme 97
b. Adaptation au type d'effort lors d'une course de canicross 98
5. La récupération 98

B. Stress oxydant et effort physique 99
1. Effet pro-oxydant de l'effort physique 99
a. Généralités 99
(1) L'effort physique constitue un stress pour l'organisme 99
(2) Augmentation de la consommation en oxygène au cours de l'effort 99
(3) Conséquences du manque d'exercice physique 99
b. Origines du stress oxydant au cours de l'effort 100
(1) Spécificités du tissu musculaire 100
(2) Origines des espèces réactives de l'oxygène produites au cours de l'effort 100
(a) Modifications biochimiques et homéostatiques du sang au cours de l'effort 100
(b) Les voies de production d'espèces réactives de l'oxygène au cours de l'effort 101
(c) Evidences de l'existence d'un stress oxydant au cours de l'effort physique 104
c. Facteurs de variation 106
(1) Influence du type d'effort physique 106
(a) L'apparition d'un stress oxydant au cours de l'exercice dépend de l'intensité et de la durée de celui-ci 106
(b) Le stress oxydant induit au cours de l'effort ne se limite pas à l'effort aérobie 107
(2) Influence des conditions environnementales 108
(a) L'altitude 108
(b) La température et l'hygrométrie 109
d. Conséquences du stress oxydant observé au cours de l'effort physique 110
(1) Conséquences sur le muscle 110
(a) Généralités 110
(b) L'évaluation des dégâts musculaires 111
(2) Les affections organiques du chien de sport en relation avec le stress oxydant et leur prophylaxie 114
(a) Les manifestations cliniques et comportementales du stress au sens large chez le chien de sport 114
(b) Les affections digestives 115
(c) La rhabdomyolyse d'effort 116
e. Prévention 117
(1) Bonnes pratiques alimentaires 117
(a) Bases de l'alimentation du chien de sport 117

(b) Gestion nutritionnelle saisonnière ... 118
(c) Gestion nutritionnelle d'une épreuve ou d'un entrainement ... 119
(d) Antioxydants et nutrition du chien de sport ... 119
(2) Limiter le stress « psychologique » ... 121
2. Effet antioxydant de l'effort physique ... 121
a. Généralités sur l'entrainement ... 121
(1) La notion d'entrainement et de surentrainement ... 121
(2) La gestion de l'entrainement ; quelques principes ... 122
(3) Application aux courses de canicross ... 122
b. Le stress oxydant observé au cours de l'effort physique peut être prévenu par l'entrainement ... 123
(1) Une adaptation de l'activité enzymatique ... 123
(2) Une adaptation des systèmes de réponse au stress ... 124
(3) Autres marqueurs de l'effet bénéfique de l'entrainement ... 124
3. Un équilibre fragile entre bénéfice de l'exercice et conséquences délétères du stress oxydant ... 125
4. Caractérisation du stress oxydant au cours de l'effort ... 125

Seconde partie : Etude expérimentale - Application au chien de cross canin réalisant un effort de courte durée sur terre

Introduction : intérêt et objectifs de l'étude ... 128

I. Sujets, matériels et méthodes ... 128

A. La population d'étude ... 128
1. Sélection de la population ... 128
2. Recueil des commémoratifs de chaque individu prélevé ... 129
3. L'échantillonnage ... 130
4. Caractéristiques de la population étudiée ... 130
5. Caractéristiques de l'effort étudié ... 131
6. Conditions météorologiques ... 132

B. La procédure expérimentale ... 132
1. Les prélèvements ... 132
a. Pertinence du recours à un prélèvement de sang ... 132
b. Le recueil des prélèvements ... 132
2. Les techniques d'analyse biologiques utilisées ... 135
a. Dosage de la paraoxonase-1(PON-1) ... 135
b. Mesure de la plasticité membranaire érythrocytaire par raisonnance paramagnétique électronique (RPE) ... 135
(1) La théorie de la RPE ... 135
(2) Application pratique à l'appréciation de la fluidité et de l'ordre membranaire des érythrocytes 137
Réalisation pratique et prélèvement ... 139

C. L'analyse statistique ... 141

II. Résultats ... 141

A. Bilans biochimiques ... 141
1. Valeurs de référence ... 141
2. Bilans biochimiques avant course ... 142
a. Données ... 142
b. Conclusions ... 143
3. Bilans biochimiques après effort ... 143
a. Données ... 143
b. Conclusions ... 146

B. Dosage de la paraoxonase-1 (PON-1) ... 148

D. Mesure du temps de corrélation-relaxation T_C à partir de spectres de RPE ... 150

III. Discussion ... 152

A. Les biais du protocole ... 152

1. Le biais d'échantillonnage..... 152
2. Le biais de mesure..... 152
B. Confrontation des résultats 152

IV. Perspectives……..156

V. Conclusion……...……...157

LISTE DES ANNEXES

- Annexe n°1 : Fiche de renseignements pour la prise de commémoratifs 161

- Annexe n°2 : Règlement des épreuves de canicross, caniVTT et disciplines mono-chiens de la Fédération des Sports et Loisirs Canins 163

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- Figure 1 : Dates clés de l'histoire du cross canin 23

- Figure 2 : Pratique du skijöring 24

- Figure 3 : Le ski pulka 24

- Figure 4 : Pratique du traineau à chiens en attelage « tandem double » 25

- Figure 5 : « Canicrosseuse » et son chien au départ du Trophée Sud Bourgogne 2010 26

- Figure 6 : Attelage de 4 chiens en kart sur le Trophée Sud Bourgogne 2010 27

- Figure 7 : « Vélocrosseur » et son chien sur le Trophée Sud Bourgogne 2010 28

- Figure 8 : Pratique de la patinette à chiens 29

- Figure 9 : Chien de race Greyster 30

- Figure 10 : Chien de race Husky Sibérien 31

- Figure 11 : Chien Alaskan Husky 32

- Figure 12 : Chien au départ d'une course de vélocross – Un exemple de harnais 33

- Figure 13 : Chien et coureur au départ d'une course de vélocross – Illustration du mode d'attache de la longe au VTT 34

- Figure 14 : Représentation des électrons de valence de l'oxygène moléculaire (les traits représentent des paires d'électrons) 36

- Figure 15 : Le transfert d'électrons à travers les trois complexes enzymatiques respiratoires de la membrane mitochondriale interne 45

- Figure 16 : Métabolisme de la xanthine oxydoréductase et genèse d'espèces réactives de l'oxygène 48

- Figure 17 : Les voies de production d'énergie 96

- Figure 18 : Réaction de Lohman 112

- Figure 19 : Matériel utilisé pour le prélèvement des échantillons 135

- Figure 20 : Matériel utilisé pour le prélèvement et la conservation temporaire des échantillons 134

- Figure 21 : Centrifugeuse utilisée au cours des expériences 134

- Figure 22 : Levée de dégénérescence sous l'effet d'un champ magnétique H 136

- Figure 23 : Les sondes 16-NS et 5-NS 137

- Figure 24 : Détermination du temps de corrélation-relaxation T_c à partir d'un spectre obtenu par RPE 139

- Figure 25 : Schéma synoptique du spectromètre de RPE 140

- Figure 26 : Répartition du logarithme de l'activité plasmatique de la CK au cours des 4 temps de prélèvements 145

- Figure 27 : Répartition de l'activité de l'ASAT au cours des 4 temps de prélèvement 146

- Figure 28 : Répartition de l'activité de la PON-1 au cours des 4 temps de prélèvement 149

- Figure 29 : Répartition du temps de corrélation-relaxation Tc au cours des 4 temps de prélèvement 151

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Les cofacteurs minéraux des principales enzymes anti-oxydantes 60

- Tableau 2 : Traduction clinique des différents états de stress chez le chien 115

- Tableau 3 : Efficacité de quelques aides nutritionnelles ergogènes à activité antioxydante, disponibles sur le marché chez le chien 120

- Tableau 4 : Caractéristiques de la population d'étude 130

- Tableau 5 : Effectifs des types raciaux de la population d'étude 130

- Tableau 6 : Vitesses de course et distance totale parcourue au cours du trophée 131

- Tableau 7 : Bilans biochimiques à T0A 142

- Tableau 8 : Bilans biochimiques à TtA 143

- Tableau 9 : Bilans biochimiques à T0B 144

- Tableau 10 : Bilans biochimiques à TtB 144

- Tableau 11 : Résultats des dosages de l'activité de la PON-1 148

- Tableau 12 : Résultats des mesures du temps de corrélation-relaxation Tc 150

LISTE DES ABREVIATIONS

‘O_2 ou $^1O_2$: oxygène singulet
µg : microgramme
µmol ou µM : micromole
16-NS : 16 doxyl acide stéarique
5-NS : 5 doxyl acide stéarique
8-OH-dG : 8-hydroxydéoxyguanosine
A.A ou aa : acides aminés
AAFCO : Association of American Fed Control Officials
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AGPL : acides gras polyinsaturés
ALT ou ALAT : alanine aminotransférases
AMP : adénosine monphosphate
ARN : acide ribonucléique
$ArO^{\bullet}$: radical tocophéryl
ArOH : alpha tocophérol
AscH : acide ascorbique
AST ou ASAT : aspartate aminotransférase
ATP : adénosine triphosphate
BAP : Biological Antioxidant Potential
C : carbone
CALC ou Ca : calcémie
CaO_2 concentration artérielle en oxygène
CAT : catalase
CHOL : cholestérolémie
Cl ou CL : chlore
CO : monoxyde de carbone
CO_2 : dioxyde de carbone
$CO_3^{-\bullet}$: radical carbonate
COX : cyclooxygénase
CREAT : créatininémie
Cu : cuivre
CvO_2 : concentration veineuse en oxygène
D.O : densité optique
DC : débit cardiaque
DHA : déhydroascorbate
EDTA : éthylène diamine tétra acétique
ESD : Egil Ellis Sled Dog
FAC : Fédération Athlétique Canine
FAD+ : flavin adénine dinucléotide, forme oxydée
$FADH_2$: flavin adénine dinucléotide, forme réduite
FCI : Fédération Canine Internationale
Fe : fer
FFPTC : Fédération Française de Pulka et de Traineau à Chiens
FFSLC : Fédération Française des Sports et des Loisirs Canins
FFST : Fédération Française des Sports de Traine
FMN : flavin monnucléotide, forme oxydée
$FMNH_2$: flavin monnucléotide, forme réduite
GGT : gamma glutamyl transférases
GHS : glutathion réduit
GLUC ou Glyc : glycémie
GPX : glutathion peroxydase
GRD : glutathion réductase
GSSG : glutathion disulfide ou glutathion oxydé
GST : glutathion S-transférase
H_2 : dihydrogène
H_2O : eau
H_2O_2 : peroxyde d’hydrogène ou eau oxygénée
HCl : acide chlorhydrique
HDL : High Density Lipoprotein
$HO_2^{\bullet}$: radical hydroperoxyl
HOCl : acide hypochloreux
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
Hz : Hertz
IFSS : International Federation for Sled Dog Sports
IL : interleukine
K : kaliémie
kDa : kilodaltons
kg : kilogramme
km : kilomètre
LDL : Light Density Lipoprotein
LOF : Libre des Origines Françaises
LOOH : hydroperoxyde lipidique
MDA : aldéhyde dimalonique
mg : milligramme
Mn : manganèse
N : azote
N_2 : diazote
NA ou Na : natrémie
NAD+ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
$NADH_2$: nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NF-κB : nuclear factor-kappa B
nmol : nanomole
$NO^{\bullet}$: oxyde nitrique
$NO_2^{\bullet}$: dioxyde d'azote
NOS : monoxyde d'azote synthétase
O : oxygène
O_2 : dioxygène
$O_2^{-\bullet}$: radical superoxyde
O_3 : ozone
^{-}OCl : hypochlorite
OH : groupement alcool
$OH^{\bullet}$: radical hydroxyle
ONOO : peroxynitrite
ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity
OX : oxydase
PAL : phosphatases alcalines
$PGF_2\alpha$: prostaglandines $F_2\ \alpha$
PGH_2 prostaglandine H_2
PHOS : phosphatémie
PON : paraoxonase
PT ou PROT : protéinémie totale
QH : ubiquinone
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
$RO^{\bullet}$: radical alkoxyl
$RO_2^{\bullet}$: radical peroxyle
ROMs : Reactive Oxygen Metabolites
ROS : Reactive Oxygen Species
RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
RSE : Résonance de Spin Electronique
SCC : Société Centrale Canine
SH : groupement thiol
SOD : Superoxyde Dismutase
SOOH : acide sulfonique
TAC : Total Antioxidant Capacity
TBARS : ThioBarbituric Acid Reactive Substances Assay
TMOP : tétraméthoxypropane
TNF : Tumor Necrosis Factor
TSB : Trophée Sud Bourgogne
UI : Unité Internationale
UREE : urémie
VO_2 : puissance maximale aérobie
VTT : Vélo Tout Terrain
W : Watt
Zn : zinc

INTRODUCTION

"Oxygen has been a trouble-maker since the very beginning."

Doris Aberlo

Gaz indispensable à la vie, l'oxygène est apparu simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues, il y a plus de 2,5 milliards d'années. Dans l'esprit de chacun, l'oxygène est perçu comme une source de vie. Pourtant, la citation de Doris Alberto illustre l'ambivalence du rôle de cette molécule au sein du vivant, depuis son commencement. En effet, l'oxygène est indispensable à la respiration des organismes aérobies, animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie. Son rôle indispensable dans les « combustions respiratoires » à l'origine de l'énergie chez les animaux a été démontré par Lavoisier au XVIII^{e} siècle. En revanche, pour certains organismes anaérobies, il est toxique. L'évolution s'est accompagnée d'une adaptation des organismes vivants à l'oxygène, se traduisant par l'apparition d'enzymes facilitant sa consommation mais aussi la dégradation de ses métabolites toxiques, qualifiés d'espèces réactives de l'oxygène. Intervenant dans de nombreuses pathologies, les phénomènes de stress oxydant ont, pour origine, un dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites. La toxicité des espèces réactives de l'oxygène l'emporte sur les mécanismes physiologiques de régulation, à l'origine de dommages oxydatifs moléculaires pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires.

L'intervention du stress oxydant dans la pathogénie de nombreuses affections, de même qu'au cours de l'effort physique, est démontrée par de nombreuses études chez l'homme et ce, depuis plusieurs dizaines d'années. Chez le chien, l'impact du stress oxydant au cours de l'effort a surtout été étudié chez le chien de traineau, dans le cadre de courses d'ultraendurance en conditions extrêmes. Le développement récent des sports de trait canins sur terre et le faible nombre d'études sur ce sujet a motivé ce travail de thèse. L'objectif de la première partie de notre travail est de récapituler l'état des connaissances en matière de stress oxydant chez le chien, plus particulièrement au cours de l'effort physique et, parfois, par extrapolation à partir de résultats d'études réalisées chez l'homme. La seconde partie, expérimentale, a pour objectif la mise en évidence de marqueurs du stress oxydant avec, pour hypothèse de départ, l'existence d'un stress oxydant chez le chien de cross canin réalisant un effort de courte durée sur terre.

Première partie : étude bibliographique

I. Le cross canin et ses disciplines apparentées, une activité récente en expansion

A. Une discipline née des sports de traine

1. L'Alaska, berceau des sports de traine

La reconnaissance du traineau à chiens en tant que discipline sportive remonte au début de notre siècle. Soucieux de comparer leurs attelages en termes de force et de rapidité, des groupes de passionnés se forment en Amérique du Nord alors que l'Alaska connait la ruée vers l'or. Il n'en faut pas plus pour que naissent le sport de traineau à chiens et le ski-pulka.

Le terme *musher* désigne le conducteur de l'attelage. Il dérive en fait du français *marche,* ordre donné par les canadiens francophones pour faire progresser leurs attelages.

2. Historique de la discipline en France

Les courses de chiens de traineau apparaissent en France à la fin des années 1970, à partir des pratiques Alaskanes et Norvégiennes. Conditionnée et limitée par le climat tempéré européen, la durée de la saison hivernale ne permet, alors, la pratique du traineau à chiens seulement quatre mois par an. Se développent, par la suite, différentes techniques d'entrainement des chiens sur terre le reste de l'année, lorsque l'enneigement fait défaut (kart ou traineau à roues, course du musher derrière son chien, musher à vélo derrière son chien). Le cross canin a donc, pour origine, l'entrainement des mushers et les courses d'attelage de chiens de traineau. Il constitue, à l'origine, une variante d'entrainement des chiens durant la saison estivale sans neige. Puis, ces entrainements sur terre ont fait naitre les courses sur terre, précédant ou prolongeant la saison de neige. Cette pratique est devenue progressivement un sport à part entière, qui peut être pratiqué comme un simple loisir ou en compétition.

La Figure 1 récapitule quelques dates clés de l'histoire du cross canin.

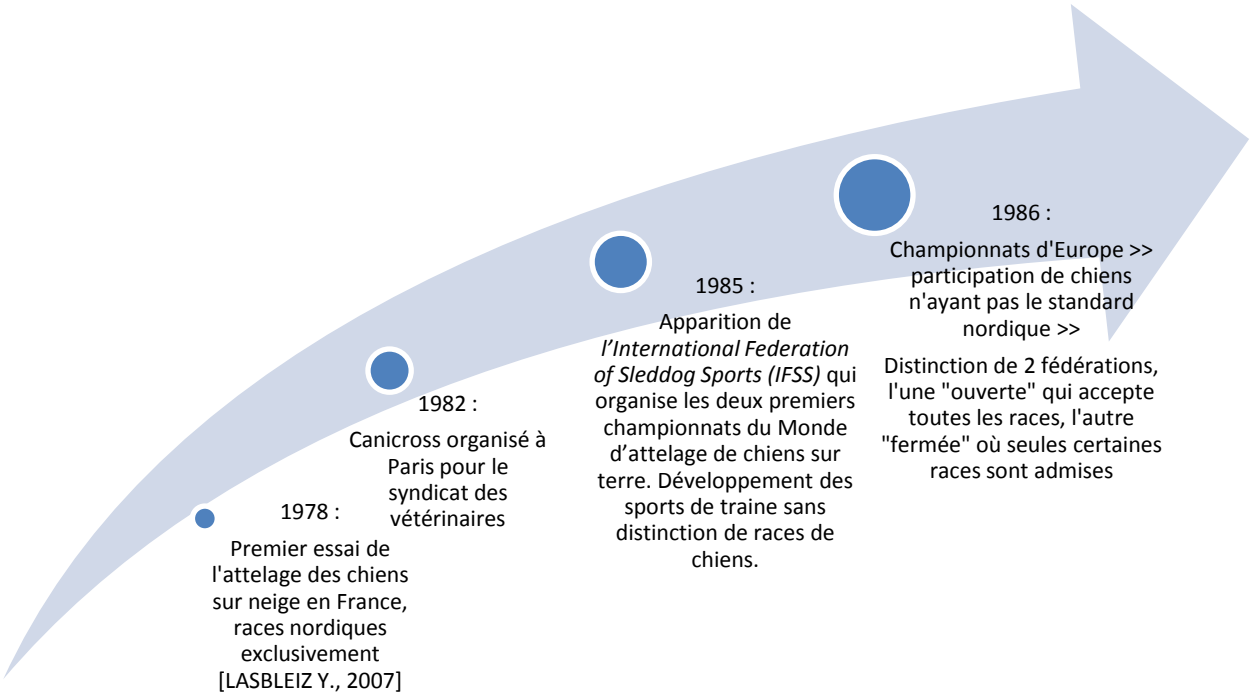


Figure 1 : Dates clés de l'histoire du cross canin (D'après [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010] et [LASBLEIZ Y., 2004])

Depuis quelques années, le cross canin attire de plus en plus d'athlètes, cyclistes et triathlètes. La France est actuellement le pays comptant le plus d'adeptes du cross canin, suivi par la Belgique et la Suisse.

B. Les différentes pratiques dérivées des sports de traine

Le terme *mushing* désigne, à l'origine, l'activité des *mushers* en tant que conducteurs de traineaux à chiens. Il est, dorénavant, utilisé pour caractériser tout ce qui concerne les sports de trait canins.

1. Les pratiques sur neige

a. Le skijöring

Le skijöring est une discipline nordique dans laquelle le concurrent est un skieur de fond suivant un ou plusieurs chiens attelés via une ligne tendue entre la ceinture du skieur et le harnais du chien. La Figure 2 illustre la pratique du skijöring.

Figure 2 : Pratique du skijöring (D'après http://www.pbase.com)

b. Le ski-pulka

Le ski-pulka est une discipline nordique dans laquelle le concurrent est un skieur de fond suivant un ou plusieurs chiens attelés à un petit traineau dénommé pulka (Figure 3).

Figure 3 : Le ski pulka (D'après http://www.levillagedemusher.com/blogs_mushing)

c. Le traineau à chiens

Le traineau à chiens est la discipline la plus connue. Les traineaux sont longs, à fond plat, très légers pour les courses de sprint. Ils sont construits en bois ou en nouveaux matériaux (fibres de carbone par exemple). Le plus souvent, les chiens sont attelés avec la technique du tandem double, deux par deux de chaque côté d'une ligne centrale unique La Figure 4 illustre ce mode d'attache.

Figure 4 : Pratique du traineau à chiens en attelage « tandem double » (D'après http://www.tourisme-hautes-pyrenees.com)

2. Les pratiques sur terre

a. Le canicross ou cross canin au sens strict

Dans le règlement des épreuves de canicross et vélocross de la Fédération des Sports et Loisirs Canins (Annexe n°2 de ce manuscrit), le canicross est défini comme *une discipline ayant comme spécificité l'union d'un seul chien et d'un coureur à pieds reliés entre eux de façon bien définie, effectuant de concert le même effort physique sur un parcours tracé à l'avance* (Figure 5). Notons que les premiers canicrosseurs couraient avec leur chien tenus en laisse à la main.

Par extension ou abus de langage, il arrive d'utiliser le terme *canicross* pour évoquer l'ensemble des différentes pratiques de trait canin sur terre décrites dans les paragraphes suivants. Précisons, ici, que le titre de notre travail évoque le *chien de cross canin*. Par ce terme, il entend s'intéresser au chien réalisant un effort de courte durée sur sol non enneigé, qu'il s'agisse de canicross au sens strict (coureur avec son chien) ou d'un sport de trait recourant à l'utilisation de matériel annexe (kart, VTT, etc…).

Figure 5 : « Canicrosseuse » et son chien au départ du Trophée Sud Bourgogne 2010 [TISSIER M., 2010]

Il existe un large éventail d'épreuves de cross canin allant des courses de sprint (5 à 7 kilomètres) aux épreuves de randonnée canine (canirando) ou de trail canin (canitrail) se déroulant sur des distances pouvant aller jusqu'à 20 kilomètres en une ou plusieurs étapes sur un ou 2 jours.

b. Le kart

L'outil d'entrainement fondamental du musher à partir de deux chiens est le kart (Figure 6). Il s'agit d'un traineau à roues auquel le musher attelle ses chiens lorsque la neige fait encore défaut, généralement dès le mois de septembre. De fabrication généralement artisanale, il existe des karts à trois ou quatre roues. Les karts à quatre roues sont plus stables mais présentent l'inconvénient d'un angle de braquage moins important.

Figure 6 : Attelage de 4 chiens en kart sur le Trophée Sud Bourgogne 2010 (D'après FIEVET E., www.france-mushing.com)

c. Le bike-jöring ou vélocross ou caniVTT

Dans le règlement des épreuves de canicross et vélocross de la Fédération des Sports et Loisirs Canins, le vélocross ou CaniVTT est défini comme une *discipline ayant comme spécificité l'union d'un seul chien et d'un cycliste reliés entre eux de façon bien définie, effectuant de concert le même effort physique sur un parcours tracé à l'avance* (Figure 7). Le matériel utilisé est sensiblement le même que pour le *ski-jöring*.

Figure 7 : « Vélocrosseur » et son chien sur le Trophée Sud Bourgogne 2010 [TISSIER M., 2010]

d. Le roller ou patinette à chiens ou scooter ou cani-trottinette

Le roller ou patinette se pratique avec un ou deux chiens, reliés à l'engin par une ligne de traine. Le musher peut rester sur la patinette ou descendre et/ou patiner afin d'aider les chiens (Figure 8).

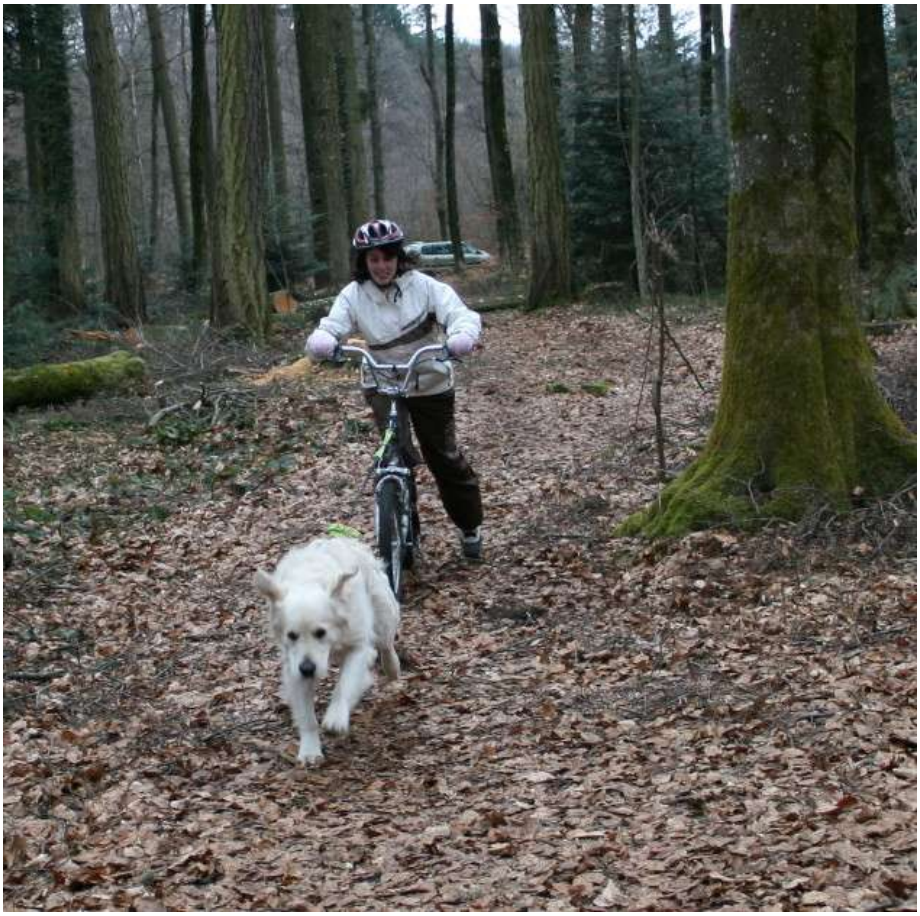


Figure 8 : Pratique de la patinette à chiens (D'après http://www.viveleschiens.com)

C. Aspects réglementaires du sport canin

1. Les institutions

Concernant les sports de trait canin, on distingue, actuellement, en France, deux fédérations sportives de chiens de traineau ; la FFST (Fédération Française des Sports de Traine) et la FFPTC (Fédération Française de Pulka et de Traineau à Chiens). Il s'agit d'une situation particulière où le sport de traineau à chiens est représenté par deux fédérations.

- La Fédération Française des Sports de Traine (FFST) est une fédération dite « ouverte » dans le sens où elle accepte tous les types de chiens qu'ils soient de race pure, de type Nordique, chiens de chasse ou croisés. Cette fédération est agréée par le Ministère de la Jeunesse et des Sports et a reçu la délégation du Ministère jusqu'en 2007. Elle seule possède la compétence de délivrer des titres territoriaux (championnats régionaux, départementaux ou de France). Elle est affiliée à l'ESDRA (antenne Européenne de la Fédération Internationale des Sports de Traine) ainsi qu'à l'IFSS (International Federation for Sled Dog Sports).

- La Fédération Française de Pulka et de Traineau à Chiens (FFPTC) est une fédération dite « fermée » dans le sens où elle n'accepte que les chiens de traineau inscrits au Livre des Origines Françaises (LOF) ou à tout autre livre des origines reconnu par la Fédération Cynophile Internationale. Il s'agit d'une association loi 1901, agréée par le

Ministère de la Jeunesse et des Sports. Cependant, elle n'a pas de délégation de service public. Cette dernière a été confiée à la FFST. La FFPTC n'est donc pas habilitée à délivrer des titres officiels et ses règlements ne sont pas d'ordre public. Elle est affiliée à la Fédération Internationale Sportive de Traineau à Chiens et est associée à la Société Centrale Canine (SCC).

Concernant plus particulièrement la pratique des sports de traine sur terre, la FFSLC (Fédération Française des Sports et des Loisirs Canins) est le successeur de la FAC (Fédération Athlétique Canine). Elle est leader en matière de sport monochien et organise de nombreuses compétitions sur le territoire.

2. Profil du chien participant aux sports de traine sur terre

Dans l'esprit de la Fédération Française des Sports de Traine (FFST), le règlement de la Fédération des Sports et des Loisirs Canins (FFSLC) stipule que les chiens autorisés à participer aux épreuves sont des chiens de toute taille et de toute race, sans distinction de pedigree, à l'exception des chiens de première catégorie. Sur les épreuves, on retrouve, dans la majorité des cas, des chiens de type Greyster ou apparentés. Les races nordiques sont aussi fréquemment représentées dans la mesure où la participation aux courses sur terre fait partie intégrante de l'entrainement des chiens de traineaux durant la période estivale.

a. Les races typées « chasse »

Le **Greyster** est issu d'un croisement entre le Braque Allemand et le Greyhound mais ce n'est pas une race reconnue par la Fédération Cynologique Internationale (FCI). Il mesure 68 à 75 cm, son poids est de 25 à 35 kg. Le poil est court, la robe bringée noire ou marron (Figure 9). C'est un chien conçu pour les courses de vitesse, sur des distances de 6 à 30 km, qui ne dispose pas d'une endurance suffisante pour les courses de traineau longue distance [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

Figure 9 : Chien de race Greyster (D'après http://www.lebonchien.fr)

b. Les races Nordiques et apparentées

Le **Husky de Sibérie** est une race reconnue par la FCI. Il mesure 50 à 60 cm, son poids est de 15 à 30 kg. Le poil est double et de longueur moyenne, toutes les couleurs de robe sont admises, du noir au blanc pur (Figure 10).

Figure 10 : Chien de race Husky Sibérien (D'après http://www.lebonchien.fr)

L'Alaskan Husky (Figure 11) a été créé par des mushers alaskans par croisements de Huskies sibériens, de chiens locaux et d'autres races sportives, il s'agit du chien de traineau le plus performant de par le monde mais ce n'est pas une race reconnue par la FCI. Il mesure 45 à 65 cm et pèse 18 à 26 kg [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010]. Son phénotype peut être extrêmement variable.

Figure 11 : Chien Alaskan Husky (D'après http://www.lebonchien.fr)

3. Matériel utilisé

a. Le harnais

Un harnais est obligatoire dans toutes les épreuves. Il doit être adapté à la morphologie du chien participant. La Figure 12 illustre un exemple de harnais.

Figure 12 : Chien au départ d'une course de vélocross – Un exemple de harnais [TISSIER M., 2010]

b. Les longes

Pour la pratique du cross canin au sens strict, il est obligatoire d'utiliser une laisse ou une longe avec un amortisseur de 2 mètres maximum en extension. Le coureur porte une ceinture abdominale, un baudrier ou encore un cuissard avec ceinture intégrée.

Pour la pratique du vélocross, il est obligatoire d'utiliser une laisse ou une longe avec un amortisseur de 2,50 mètres maximum en extension. La longe est attachée au VTT via une barre d'attache fixée à l'avant du cadre (Figure 13).

Figure 13 : Chien et coureur au départ d'une course de vélocross – Illustration du mode d'attache de la longe au VTT [TISSIER M., 2010]

4. L'âge du chien participant

Les individus doivent être âgés d'au moins 12 mois le jour de la course et de 18 mois au moins le jour de l'épreuve de vélocross.

5. Type d'effort

Le règlement des épreuves de canicross et de vélocross de la Fédération des Sports et Loisirs Canins précise que l'organisateur de l'épreuve doit adapter les distances de course en fonction de la saison et des conditions météorologiques. Les distances de course varient de 1,5 à 9 kilomètres selon les catégories. Les points d'eau sont obligatoires à mi parcours dès que la distance de course excède 5 kilomètres et obligatoires tous les 2 kilomètres dès que la température extérieure excède 20°C. Les courses ne sont pas autorisées si la température extérieure dépasse 30°C.

Durant la course, le chien doit en permanence être situé à l'avant du coureur, la limite maximale autorisée pour le coureur étant la hauteur des épaules de l'animal. Il est interdit de tirer le chien sauf pour le remettre dans le sens de la course.

Les chiens ne peuvent participer qu'à une seule course par jour à l'exception des épreuves de canicross enfants et de canimarche.

De nombreuses autres conditions concernant le profil du chien participant aux compétitions (conditions sanitaires notamment) sont détaillées dans le règlement de la Fédération, inséré en annexe de ce manuscrit (Annexe n°2).

II. Le stress oxydant

A. Définition du stress oxydant

1. Rappels concernant les mécanismes d'oxydoréduction

L'oxydation ne signifie pas seulement l'addition d'atomes d'oxygène. Plus généralement, elle caractérise une réaction où une molécule perd un ou plusieurs électrons. La réduction correspond à un gain d'électrons. Un agent oxydant est une substance qui accepte des électrons. Un agent réducteur est une substance qui donne des électrons à une autre substance. Au cours d'une réaction d'oxydoréduction, l'agent oxydant est réduit et l'agent réducteur est oxydé pour que le nombre d'électrons soit conservé. Un composé est qualifié d'auto-oxydable si sa forme réduite peut être oxydée par le dioxygène.

Présentons un exemple de réaction d'oxydoréduction, la réduction du dioxygène en eau :

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2\ H_2O$$

Les cellules utilisent des enzymes pour catalyser l'oxydation des molécules organiques par étapes dans une séquence de réactions qui permet à l'énergie utile d'être récoltée [STEVEN C., 2006] [ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS et WALTER, 1999].

2. Les espèces réactives et les radicaux libres de l'oxygène

La quasi totalité de l'oxygène consommé par l'organisme est utilisé au niveau mitochondrial pour la production d'ATP et est réduit en eau. Cependant, une petite fraction de cet oxygène (1 à 4%) peut être convertie en intermédiaires qualifiés d'espèces réactives de l'oxygène. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, on distingue les espèces radicalaires appelées radicaux libres et les espèces non radicalaires [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

a. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme des *espèces chimiques capables d'une existence indépendante et possédant une orbitale dont un électron au moins est non apparié ou célibataire.* Un électron apparié occupe une orbitale atomique ou moléculaire par lui-même. Les radicaux libres, par la présence en leur sein, d'un ou plusieurs électrons non appariés, sont sensibles à un champ magnétique. C'est la raison pour laquelle ils sont qualifiés d'entités paramagnétiques [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Les radicaux libres sont des sous produits des réactions cellulaires d'oxydoréduction, des éléments hyperactifs capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la valence de leur orbitale. Ils auront tendance à « arracher » des atomes aux molécules pour reconstituer une paire d'électrons assurant une liaison sable [CHANDAN K. SEN, 1995] [GRANDJEAN D., 2001]. En effet, les liaisons entre atomes sont principalement réalisées par la mise en commun de deux électrons. Les radicaux libres peuvent être formés suite à la perte

ou le gain d'un électron à partir d'une entité non radicalaire; ils vont donc agir en tant qu'agent oxydant (cas le plus fréquent) ou réducteur [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [STEVEN C., 2006].

Dans ce qui suit, le sigle « • » représente un électron célibataire.

$$\text{Oxydation : R-X} \rightarrow \text{R-X}^{\bullet +} + e^- \rightarrow R^\bullet + X^+ + e^-$$

$$\text{Réduction : R-X} + e^- \rightarrow \text{R-X}^{\bullet -} \rightarrow R^\bullet + X^-$$

Les radicaux libres peuvent également être produits par fission homolytique, c'est-à-dire par rupture symétrique d'une liaison covalente, à l'issue de laquelle chaque atome conserve un électron [JUNGBLUTH G., 2008] ;

$$\text{Fission homolytique : R-X} \rightarrow R^\bullet + X^\bullet$$

Le caractère radicalaire de ces espèces leur confère généralement une grande instabilité énergétique. En effet, elles ont tendance, pour satisfaire à la règle de l'octet, à revenir à leur état stable en captant un électron pour combler leur orbitale, à partir d'une molécule (espèce non radicalaire) ou d'un autre radical libre [JUNGBLUTH G., 2008].

Ces radicaux vont réagir avec d'autres molécules en générant des actions délétères sur la molécule atteinte mais également en engendrant la formation d'un nouveau radical, à l'origine d'une réaction en chaine auto-accélérée en l'absence de substances anti-radicalaires [CHANDAN K. SEN, 1995].

b. Notion de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène

La molécule d'oxygène diatomique est qualifiée de diradical libre puisqu'elle possède, sur sa couche externe, deux électrons célibataires à spins parallèles sur les douze électrons présents (Figure 14). Sa couche de valence, incomplète, en fait un puissant oxydant [JUNGBLUTH G., 2008].

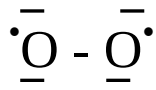


Figure 14 : Représentation des électrons de valence de l'oxygène moléculaire (les traits représentent des paires d'électrons) [D'après JUNGBLUTH G., 2008]

On parle de triplet ($^3O_2$). Il s'agit de la forme stable. Elle est inerte vis-à-vis de la plupart des molécules organiques, qui sont des singulets (qui ont tous leurs électrons appariés ou deux électrons célibataires de spins antiparallèles - cf. règles de Wigner -). Pour réagir avec ces composés, une activation est nécessaire, de différentes manières tel qu'un passage à l'état singulet $^1O_2$ [JUNGBLUTH G., 2008].

Règles de Wigner :

- les singulets (molécules à électrons uniformément appariés) réagissent aisément avec les doublets (ou radicaux libres, caractérisés par la présence d'un électron non apparié), mais leur réaction avec les triplets (présence de deux électrons non appariés) est interdite,
- les doublets réagissent généralement plus lentement entre eux,
- les doublets réagissent lentement avec les triplets.

L'oxygène accepte préférentiellement des électrons un par un, ce qui explique qu'il réagisse avec grand nombre de radicaux libres. En effet, en accord avec le principe d'exclusion de Pauli, une orbitale atomique ou moléculaire ne peut contenir que des paires d'électrons de spins opposés ou antiparallèles. L'oxygène peut donc réagir avec d'autres radicaux mais seulement par transferts d'un électron à la fois [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Les radicaux libres de l'oxygène sont des molécules oxygénées plus réactives que l'oxygène que l'on retrouve dans l'air [SOFFLER C., 2007].

Il existe d'autres molécules réactives contenant de l'oxygène, non radicalaires [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001]. En effet, la littérature anglo-saxonne distingue les radicaux libres de l'oxygène et les espèces réactives de l'oxygène (*ROS* pour *reactive oxygen species*). Ces dernières incluent des espèces non radicalaires de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ozone (O_3) qui sont capables d'induire des lésions tissulaires oxydantes [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003] [CHANDAN K. SEN, 1995].

Ainsi, tous les radicaux libres de l'oxygène sont des espèces réactives de l'oxygène mais toutes les espèces réactives de l'oxygène ne sont pas des radicaux libres [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

En résumé, les espèces réactives de l'oxygène regroupent ;
- les radicaux libres de l'oxygène,
- les espèces non radicalaires de l'oxygène à potentialités oxydantes.

En raison de leur importante réactivité, les espèces réactives de l'oxygène réagissent avec la plupart des molécules organiques qu'elles sont amenées à rencontrer, à l'origine d'une production de métabolites réactifs (*ROMs pour reactive oxygene metabolites*) possédant une action oxydante. Cependant, les métabolites réactifs sont, en général, plus stables que les espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, ils peuvent être plus facilement quantifiables [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

A présent, intéressons-nous aux principales espèces réactives de l'oxygène, radicalaires ou non.

(1) Les espèces radicalaires ou radicaux libres dérivés de l'oxygène

(a) Le radical libre superoxyde $O_2^{\bullet -}$

Parmi les espèces réactives de l'oxygène, le radical libre superoxyde est celui qui possède la réactivité la plus faible vis-à-vis des substrats bio-organiques [JUNGBLUTH G., 2008]. Il possède un électron de plus que le dioxygène dans sa forme stable [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

L'ion superoxyde est un sous produit normal de la réduction du dioxygène lors de la respiration cellulaire. Dans les conditions physiologiques, selon les auteurs, environ 1 à 4% du dioxygène est converti en ion superoxyde [STEVEN C., 2006] [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]., selon la réaction :

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

L'ion superoxyde peut avoir, d'une part, une fonction oxydante, au cours de laquelle il sera réduit en peroxyde d'hydrogène et, d'autre part, une fonction réductrice pour reformer de l'oxygène La réaction peut se produire spontanément mais, en conditions physiologiques, elle est catalysée par la superoxyde dismutase. [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Ainsi,

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Les radicaux superoxydes ne réagissent ni avec les acides nucléiques et leurs constituants, ni avec les acides aminés, ni avec les acides gras polyinsaturés. Cependant, ils ont quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}) ou l'ascorbate [JUNGBLUTH G., 2008]. Il semblerait que la toxicité du radical superoxyde s'exerce plutôt de manière indirecte, passant par la genèse d'espèces secondaires plus réactives [GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., 2003]. Ainsi, L'ion superoxyde peut réagir avec l'oxyde nitrique et former du peroxynitrite, très réactif [SOFFLER C., 2007].

L'ion superoxyde est capable d'oxyder ou de réduire des métaux de transition ionisés, à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2.

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+} \text{ (réaction de Fenton)}$$

Ainsi,

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH + O_2 \text{ (reaction d'Haber Weiss)}$$

Le gain d'un électron à partir du radical superoxyde aboutit à la formation de l'ion peroxyde O_2^{2-}, espèce non radicalaire mais faisant partie des espèces réactives de l'oxygène [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

La durée de vie du radical superoxyde est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes). Par conséquent, il peut diffuser bien au delà de son lieu de production [GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., 2003].

(b) Le radical hydroperoxyle $HO_2^{\bullet}$

Il s'agit de l'acide conjugué de l'anion superoxyde, on parle de forme protonée de l'anion superoxyde.

$$O_2^{\bullet-} + H^+ \leftrightarrow HO_2^{\bullet}$$

Le radical hydroperoxyl $HO_2^{\bullet}$ est plus réactif que le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Sa présence en solution aqueuse dépend du pH. Bien que le pH de la plupart des tissus autorise un rapport $[O_2^{\bullet-}]$ / $[HO_2^{\bullet}]$ élevé, la réactivité du radical hydroperoxyl et son caractère non ionisé lui permettent de traverser les membranes biologiques plus efficacement que le radical superoxyde [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Cela suggère qu'il est capable de causer des dégâts. Il peut réagir avec les acides gras polyinsaturés [JUNGBLUTH G., 2008].

(c) Le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$

Le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ est formé en présence de métaux de transition, par exemple l'ion ferreux Fe^{2+}, lorsque l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ réagit avec le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 au cours de la réaction d'Haber-Weiss évoquée précédemment [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ va chercher à capter un électron et se comportera donc en agent oxydant. Il s'agit d'une espèce hautement réactive, ayant un potentiel destructeur et mutagène élevé. La membrane mitochondriale y est particulièrement sensible car situé à proximité de son lieu de formation [STEVEN C., 2006].

Sa durée de vie est très courte, de l'ordre de quelques nanosecondes. Par conséquent, il s'agit d'un radical qui diffuse peu et qui réagit quasiment sur le lieu de production, à l'inverse du radical superoxyde, $O_2^{\bullet-}$, qui « a le temps » de diffuser en raison de sa relative inertie chimique. Dès qu'un radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ rencontre un substrat, il réagit dès la première collision [GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., 2003].

(d) Le radical peroxyl $RO_2^{\bullet}$

En présence d'un puissant oxydant (X^+), une molécule organique RH (singulet) peut être transformée en radical libre. Cette réaction se fait généralement par une rupture d'une liaison carbone-hydrogène (déshydrogénation) : l'atome $H^{\bullet}$ arraché cède son électron à l'oxydant. Il se forme un radical centré sur le carbone $R^{\bullet}$ (doublet) ;

$$RH + X^+ \rightarrow R^{\bullet} + H^+ + X$$

Les radicaux $R^{\bullet}$ ainsi obtenus sont transformés en radicaux peroxydes $RO_2^{\bullet}$ par addition d'une molécule de dioxygène selon la réaction :

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$$

Les radicaux peroxyl peuvent alors arracher un atome d'hydrogène $H^{\bullet}$ à une autre molécule organique RH, formant, ainsi, des hydroperoxydes RO_2H et des radicaux libres $R^{\bullet}$ comme suit :

$$RO_2^{\bullet} + RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet}$$

Les radicaux $R^{\bullet}$ peuvent réagir avec une molécule de dioxygène comme vu précédemment et propager, ainsi, une réaction en chaine produisant des hydroperoxydes. Il s'agit d'une peroxydation. Dans les cellules, cette chaine réactionnelle affecte principalement les acides gras polyinsaturés ; il s'agit de la peroxydation lipidique. Les radicaux peroxydes sont de bons oxydants [JUNGBLUTH G., 2008].

(e) Le radical carbonate $CO_3^{\bullet-}$

Il est formé lorsque $OH^{\bullet}$ réagit avec des ions carbonate CO_3^{2-} ou bicarbonate HCO_3^- ou lorsque $ONOO^-$ réagit avec le dioxyde de carbone CO_2 [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

$$CO_3^{2-} + OH^{\bullet} \rightarrow CO_3^{\bullet-} + OH^-$$

$$HCO_3^- + OH^{\bullet} \rightarrow CO_3^{\bullet-} + H_2O$$

Le radical carbonate oxyde certaines molécules dont l'acide hyaluronique et certains acides aminés que sont la guanine et la méthionine mais la contribution du radical carbonate dans les dégâts causés par un stress oxydant *in vivo* n'est pas réellement connue [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(f) Le radical alkoxyl $RO^{\bullet}$

En présence de métaux de transition (M^+), les hydroperoxydes produisent des radicaux alkoxyl $RO^{\bullet}$ qui prolongent le processus de réaction en chaine en agissant sur une molécule organique RH [JUNGBLUTH G., 2008] :

$$RO_2H + M^+ \rightarrow RO^{\bullet} + OH + M^{2+}$$

$$RO^{\bullet} + RH \rightarrow ROH + R^{\bullet}$$

(2) Les espèces réactives de l'oxygène non radicalaires

(a) Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut être formé par réaction de deux anions superoxydes, réaction catalysée par la superoxyde dismutase ;

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Il s'agit d'un intermédiaire stable mais très oxydant, capable de diffuser au sein des membranes hydrophobes et participant à la production de plusieurs molécules dont les plus réactives sont $OH^{\bullet}$ et HOCl [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005] [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. En présence de métaux de transition, principalement le fer, le

peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est capable de produire le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, selon la réaction suivante, évoquée précédemment ;

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut également être transformé en hypochlorite de sodium (eau de Javel) par la myéloperoxydase, enzyme localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles [JUNGBLUTH G., 2008].

(b) L'oxygène singulet $'O_2$ ou $^1O_2$

Il possède deux électrons appariés et est hautement réactif comparativement à $^3O_2$.

Les radicaux peroxyl $RO_2^{\bullet}$ peuvent réagir entre eux pour former l'oxygène singulet au cours de la peroxydation lipidique.

L'oxygène singulet réagit avec des molécules contenant des doubles liaisons carbone-carbone pour former des peroxydes. Par exemple, le cholestérol des membranes peut être oxydé par l'oxygène singulet et former son 5-alpha-hydroperoxyde [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(c) L'hydroperoxyde lipidique LOOH

Il peut avoir pour origine l'arrachement d'un hydrogène à un acide gras polyinsaturé (acide gras polyinsaturé membranaire par exemple) selon la réaction :

$$LOO^{\bullet} + RH \rightarrow LOOH + R^{\bullet}$$

Assez peu réactionnels, les hydroperoxydes peuvent, en présence de métaux de transition, reformer des radicaux alkoxyl et peroxyl.

En ce qui concerne les effets cellulaires des peroxydes lipidiques, ils sont similaires à ceux du peroxyde d'hydrogène [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(d) L'hypochlorite ^-OCl

L'hypochlorite provient de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et l'ion chlore, réaction catalysée par une myéloperoxydase [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow {}^-OCl + H_2O$$

L'hypochlorite réagit rapidement avec une grande variété de molécules biologiques telles que les protéines, les peptides, les lipides, l'ADN et divers aminoacides [JUNGBLUTH G., 2008].

(e) L'ozone O_3

Il s'agit d'un gaz irritant non radicalaire retrouvé dans les hautes couches de l'atmosphère. La photodissociation homolytique de gaz chlorés tels que CF_2Cl_2 et $CFCl_3$ produit $Cl^{\bullet}$ dans l'atmosphère qui réagit alors avec l'ozone via la réaction suivante :

$$Cl^{\bullet} + O_3 \rightarrow O_2 + OCl$$

L'ozone est délétère si elle est formée dans la basse atmosphère. Elle peut provenir d'une réaction entre oxydes d'azote et hydrocarbures (les gaz d'échappement sources d'hydrocarbures). C'est un puissant agent oxydant. Il peut oxyder les protéines, s'attaquer au groupement –SH, aux résidus de la tyrosine, du tryptophane, de l'histidine et de la méthionine. Les lipides, comme les protéines peuvent être les cibles d'une attaque directe de l'ozone au niveau des voies respiratoires. En solution aqueuse, l'ozone se décompose en $OH^{\bullet}$ mais au cours d'un long processus au pH physiologique. La réaction de l'ozone avec plusieurs biomolécules telles que NADPH, NADH, la cystéine, l'albumine, la méthionine ou l'acide urique produit le singulet $^1O_2$ qui pourrait secondairement générer des oxydations. L'ozone est souvent considéré comme un toxique exogène mais il serait formé *in vivo*, chez l'homme [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(3) Autres composants

Les composants suivants peuvent tous être considérés comme des espèces réactives de l'oxygène mais sont généralement regroupés sous l'appellation des espèces réactives de l'azote, il s'agit principalement du monoxyde d'azote et de ses dérivés, le dioxyde de carbone et le peroxynitrite [SOFFLER C., 2007].

(a) L'oxyde nitrique $NO^{\bullet}$

Il provient de la transformation de la ι-arginine, sous l'influence de la NO- synthétase. Il est caractérisé par une très grande diffusibilité, y compris à travers les membranes. Il possède une affinité pour les groupements thiols des protéines, le fer, l'oxygène et le radical superoxyde [JUNGBLUTH G., 2008]. En présence d'oxygène ou du radical superoxyde, l'oxyde nitrique $NO^{\bullet}$ est converti en espèces plus réactives comme, par exemple, le dioxyde d'azote $NO_2^{\bullet}$ ou le peroxynitrite $ONOO^-$, à haut pouvoir oxydant [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001] [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003] :

$$2\ NO^{\bullet} + O_2 \rightarrow 2\ NO_2^{\bullet}$$

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^-$$

Le peroxyde d'hydrogène renforcerait l'effet inhibiteur de l'oxyde nitrique sur l'agrégation plaquettaire [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(b) Le dioxyde d'azote $NO_2^{\bullet}$

Il peut être formé par réaction de l'oxyde nitrique $NO^{\bullet}$ avec le dioxygène comme le montre la réaction précédente.

Le dioxyde d'azote $NO_2^{\bullet}$ agit comme radical oxydant. Dans tous les cas, il y a formation d'un radical libre, susceptible de propager une réaction radicalaire en chaine [JUNGBLUTH G., 2008].

(c) Le peroxynitrite $ONOO^-$

Il peut être formé par réaction entre l'oxyde nitrique $NO^{\bullet}$ et l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ comme le montre la réaction précédente. Sa demi-vie est relativement longue et il est capable de traverser les membranes. Il intervient, par exemple, dans l'oxydation de l'hémoglobine et méthémoglobine. Bien qu'il soit capable d'oxyder certaines molécules dont celles possédant des groupements –SH, le peroxynitrite est une entité réactive. Son importance *in vivo* n'est pas claire. Une fois formé, le peroxynitrite est rapidement protoné en acide nitreux ONOOH [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

$$ONOO^- + H^+ \rightarrow ONOOH$$

(4) Commentaires

Dans la plupart des cas, les espèces réactives non radicalaires vont former des espèces radicalaires [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

Les espèces réactives de l'oxygène sont utiles pour l'organisme à doses raisonnables. En conditions physiologiques, elles sont rapidement dégradées avant qu'elles ne provoquent des dégâts sur les structures intra et extracellulaires. Leur durée de vie ne dépasse pas quelques microsecondes.

Dans les conditions physiologiques, l'oxygène activé toxique se trouve sous contrôle cellulaire strict et permanent ; la balance entre la formation d'espèces réactives et nuisibles de l'oxygène et les défenses anti-oxydantes de la cellule se trouvent en équilibre fragile. Dès lors que cet équilibre bascule du côté des radicaux libres, il se crée une situation dite de stress oxydant [GRANDJEAN D., 2005].

L'oxygène singulet, le radical hydroxyl et le peroxynitrite sont capables de provoquer des dommages oxydatifs directs au niveau de systèmes biologiques [HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., 2002]. L'importance de la formation de peroxynitrite, de radicaux hydroxyl et d'acide hypochloreux réside dans le fait que ces oxydants hautement réactifs sont produits à partir d'entités moins réactives ; il en résulte une amplification des dommages oxydatifs [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

3. La notion de stress oxydant

Le *stress* est un processus par lequel les facteurs de l'environnement surchargent les systèmes de régulation d'un individu et perturbent son état d'adaptation [BRUYERE H., 1991].

Le *stress oxydant* ou *stress oxydatif* est défini comme l'état d'un tissu ou d'un organisme dans lequel les réactions pro-oxydantes dépassent les capacités anti-oxydantes. La

cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques appelés radicaux libres. Ce phénomène est alors néfaste, notamment pour les membranes biologiques [GRANDJEAN D., 2005].

B. Les origines du stress oxydant

1. Généralités

Le stress oxydant peut avoir deux origines ;

- une déplétion en molécules anti-oxydantes : carence nutritionnelle absolue ou relative, vieillissement cellulaire, anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine enzymatique à fonction anti-oxydante, ou à l'origine de la synthèse d'un antioxydant

- une production excessive en espèces réactives de l'oxygène :

→ Modifications de l'apport en oxygène : lors d'une montée en altitude sans acclimatation, l'hypoxie provoque une altération du fonctionnement énergétique cellulaire. Les membranes cellulaires deviennent plus fragiles et ainsi plus facilement dégradées par les radicaux libres [GRANDJEAN D., 2005]. Lors de respiration artificielle, l'hyper-oxygénation entraine une prolifération de radicaux libres [GRANDJEAN D., 2005].

→ Substances à actions pro-oxydantes : pesticides, fumées, radiations, ultraviolets, métaux lourds.

→ Activation excessive des systèmes de production naturelle de radicaux libres lors de maladies cardio-vasculaires, de cataracte, de syndromes inflammatoires chroniques ou de proliférations tumorales.

2. Les sources de production d'espèces réactives de l'oxygène au sein des organismes aérobies

Les sources de production d'espèces réactives de l'oxygène sont nombreuses. L'exposé qui suit ne prétend pas présenter l'ensemble des mécanismes à l'origine de leur production. Nous ne nous intéresserons qu'aux mécanismes principaux.

a. La chaine respiratoire mitochondriale

La mitochondrie constitue la principale source d'ATP, nécessaire au métabolisme des animaux. Les mitochondries sont des organites intracellulaires caractérisés par une double membrane. Leur nombre varie d'un type cellulaire à l'autre et au sein même d'une cellule, en fonction de son âge et de son activité. Au cours de la glycolyse et du cycle de Krebs, il y a production de coenzymes réduits (NADH et CoQH2). « La finalité » de la chaine respiratoire est de ré-oxyder ces coenzymes en aérobiose au niveau des crêtes de la membrane interne mitochondriale grâce à un ensemble complexe de protéines membranaires (Figure 15). Cette

ré-oxydation s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons. Ce gradient est une forme de stockage de l'énergie contenue dans les coenzymes, qui dérive elle-même de l'énergie contenue dans les molécules dégradées au cours du catabolisme. Le gradient de protons va servir à fabriquer l'ATP. Ce mécanisme est appelé phosphorylation oxydative.

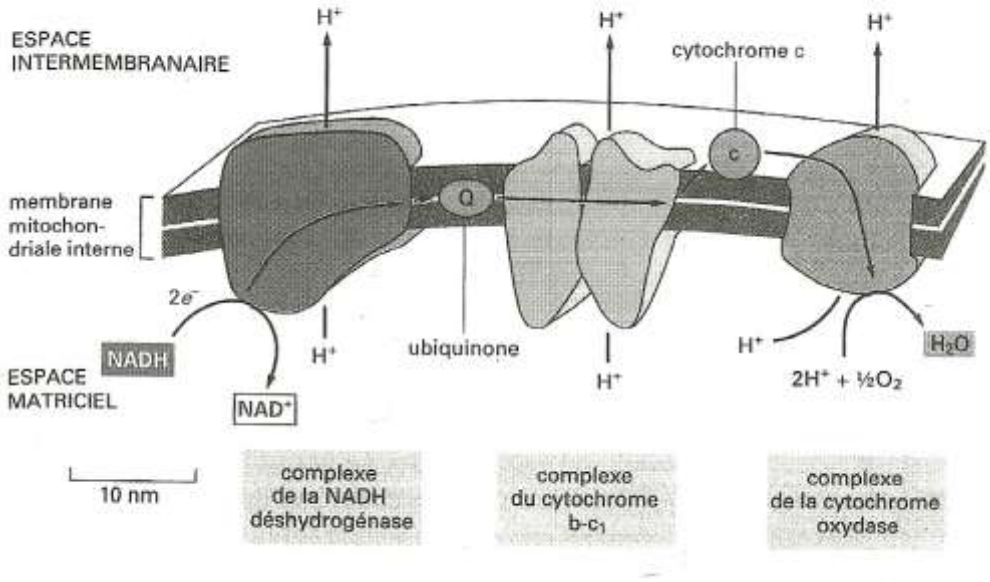


Figure 15 : Le transfert d'électrons à travers les trois complexes enzymatiques respiratoires de la membrane mitochondriale interne (D'après ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER, 1999, p. 415)

La chaine respiratoire mitochondriale est constituée de quatre complexes protéiques contenant de multiples centres d'oxydoréduction (flavines, quinones, hèmes et ions cuivre). Au sein de la chaine mitochondriale, les plus importants transporteurs d'électrons sont le NAD^+, le FMN et le FAD. Les formes réduites NADPH et $FADH_2$ transmettent leurs électrons aux complexes I et II, respectivement. Ils sont ensuite transférés au complexe III par le coenzyme Q. Enfin, le cytochrome c transporte les électrons, un par un, du complexe III au complexe IV. Le maillon terminal de la chaine de transport d'électrons qui utilise le dioxygène est la cytochrome C oxydase ou complexe IV, selon la réaction suivante [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [JUNGBLUTH G., 2008] :

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$

Un des rôles de la cytochrome oxydase est de se maintenir étroitement à sa molécule d'oxygène jusqu'à ce que les quatre électrons nécessaires pour la convertir en deux molécules d'eau soient prélevés, prévenant ainsi une attaque au hasard de molécules cellulaires par des radicaux superoxydes [ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER., 1999].

Selon les auteurs, 1 à 4% du dioxygène consommé par la mitochondrie au cours de la respiration mitochondriale des mammifères serait converti en espèces réactives de l'oxygène. La formation d'espèces réactives de l'oxygène au niveau de la chaine mitochondriale provient d'une réduction incomplète de l'oxygène. Dans de nombreuses cellules animales aérobies, *in vivo*, le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est produit, en grande partie, au sein de la chaine respiratoire mitochondriale [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Il existe deux sites de production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale : les complexes I et III. La production d'anions superoxydes au sein de la chaine fait intervenir, entre autres, l'ubiquinone selon la réaction exposée plus haut. Les radicaux superoxydes peuvent être libérés de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne et peuvent atteindre le cytosol en passant par une porine. Ils sont généralement rapidement transformés en peroxyde d'hydrogène par dismutation [JUNGBLUTH G., 2008]. Le complexe IV ne semble pas générer d'espèces réactives de l'oxygène.

Plusieurs autres enzymes mitochondriales n'appartenant pas à la chaine respiratoire sont également capables de produire des espèces réactives de l'oxygène [JUNGBLUTH G., 2008].

b. Transporteurs d'électrons, métaux de transition et production d'espèces réactives de l'oxygène

De nombreuses molécules d'importance biologique évidente sont oxydées par l'oxygène et sont à l'origine d'une production d'ion superoxyde. Il s'agit de l'adrénaline, de la noradrénaline, du glycéraldéhyde, du $FADH_2$, du $FMNH_2$, de la dopamine, des composés thiols tels que la cystéine ou encore la dihydrophénlyalanine. L'importance de ces auto-oxydations est considérablement amplifiée par l'intervention de métaux de transition, dont le manganèse, le fer et le cuivre. Il serait fort possible que toutes ces auto-oxydations soient, en réalité, catalysées par des métaux de transition [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(1) Les cofacteurs flaviniques : FAD et FMN

Ces flavoprotéines interviennent dans le mécanisme catalytique de nombreuses enzymes réalisant des oxydoréductions. Au cours de certaines d'entre elles, les cofacteurs flaviniques réduisent le dioxygène ce qui conduit à la production de superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène, selon qu'il s'agisse d'un transfert d'un ou de deux électrons [JUNGBLUTH G., 2008].

(2) La coenzyme Q ou ubiquinone

Elle est essentielle au transport mitochondrial d'électrons. On la retrouve au sein d'autres membranes cellulaires. Lorsqu'elle est sous forme radicalaire, l'ubiquinone ($QH^{\bullet}$) réduit l'oxygène en anion superoxyde comme suit :

$$QH^{\bullet} + O_2 \rightarrow Q + O_2^{\bullet-}$$

A contrario, *in vitro*, sous sa forme réduite QH_2, elle peut réagir avec un radical libre de l'oxygène $RO_2^{\bullet}$ et inhiber, ainsi, la peroxydation. *In vivo*, son rôle est encore incertain [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

$$QH_2 + RO_2^{\bullet} \rightarrow RO_2H + QH^{\bullet}$$

(3) Les métaux de transition

Certains métaux de transition dont le fer et le cuivre possèdent des électrons célibataires au sein de leurs atomes et de leurs formes ionisées. Cela leur permet de créer facilement des liaisons de coordination avec certains ligands. Leurs effets biologiques, qu'ils soient bénéfiques ou délétères pour l'organisme mettent en jeu leur caractère de donneurs ou accepteurs d'électrons libres. Le fer est probablement le plus impliqué dans les phénomènes de stress oxydant. Il est, en particulier, incriminé dans la production des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton, réaction d'Haber-Weiss). Attention, cependant, l'importance de ces réactions *in vivo* reste controversée car les métaux de transition sont complexés dans leur quasi-totalité par des composés organiques.

La complexation des métaux de transition, même si elle modifie leur réactivité, ne les rend pas nécessairement inertes. Certains ligands favorisent le transfert d'électrons vers l'oxygène. Ainsi, de nombreuses protéines confèrent aux métaux de transition une fonction catalytique, c'est le cas des protéines héminiques que sont la myoglobine et l'hémoglobine. Le fer de l'hème de l'hémoglobine et de la myoglobine est sous la forme Fe^{2+}. En présence d'oxygène, il peut y avoir production d'ion superoxyde selon la réaction [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] :

$$\text{Hème} - Fe^{2+} - O_2 \rightarrow \text{Hème} - Fe^{3+} - O_2^{\bullet -} \rightarrow \text{Hème} - Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$$

Le produit obtenu contenant le fer ferrique est la méthémoglobine ou la métmyoglobine.

Au sein des érythrocytes humains, 3% de l'hémoglobine serait oxydé chaque jour car ces cellules sont constamment exposées à un flux d'ions superoxydes.

L'oxydation de l'hémoglobine et de la myoglobine serait amplifiée en présence de nitrite et de certains métaux de transition tels que le cuivre [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

c. *Les NAPDH oxydases*

Il s'agit d'un complexe multimérique regroupant sept enzymes, présent dans de nombreux types cellulaires tels que les phagocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses. *In vivo*, ces enzymes catalysent la réaction suivante, de production d'anion superoxyde [JUNGBLUTH G., 2008] :

$$NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet -}$$

d. *La xanthine oxidoréductase*

Il s'agit de la principale enzyme cytosolique impliquée dans le catabolisme des bases puriques. La conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase peut se produire, *in vivo*, au sein de tissus lésés. Elle conduit, alors, à la production d'anion superoxyde [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] (Figure 16).

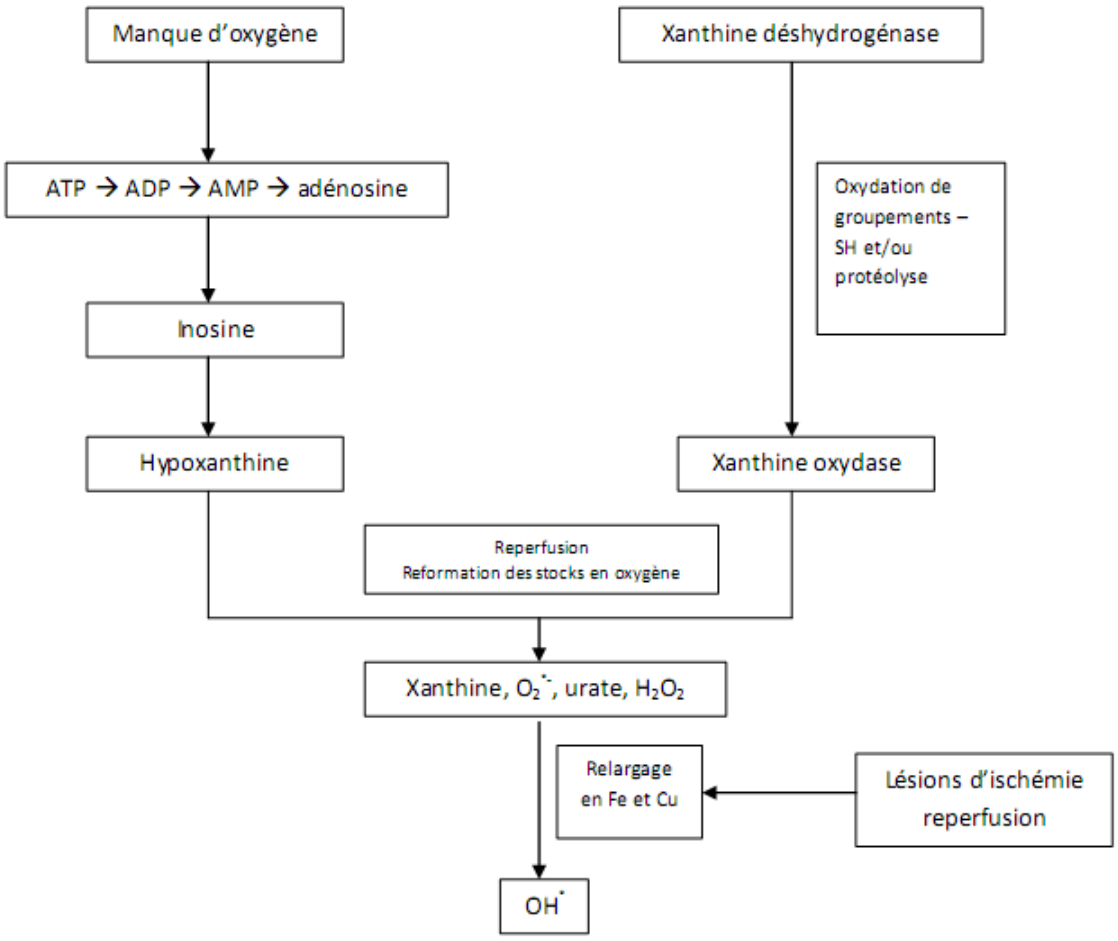


Figure 16 : Métabolisme de la xanthine oxidoréductase et genèse d'espèces réactives de l'oxygène (D'après HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007)

e. Les oxydases des peroxysomes

A l'exception des érythrocytes, au sein des cellules animales, les oxydases (OX) sont largement retrouvées au niveau d'organites entourés par une membrane simple ; les peroxysomes et qui sont présents dans divers tissus dont le foie et les reins. Les peroxysomes détiennent plusieurs enzymes qui génèrent du peroxyde d'hydrogène. Citons, entre autres, l'urate oxydase, la glycolate oxydase [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

$$RH_2 + O_2 \text{ - OX} \rightarrow R + H_2O_2$$

Bien que les peroxysomes possèdent une enzyme à action anti-oxydante, la catalase, une partie de la production de peroxyde d'hydrogène passe dans le cytoplasme [JUNGBLUTH G., 2008].

f. Les cytochromes P450

Le réticulum endoplasmique et d'autres organites détiennent des cytochromes connus couramment sous le nom de cytochromes P450. Ce sont des protéines héminiques essentiellement présentes dans le foie et impliquées dans le métabolisme des médicaments et autres xénobiotiques, de l'acide arachidonique, du cholestérol, de la vitamine D3, des eicosanoïdes. Ils catalysent l'oxydation de substrats par le dioxygène selon la réaction :

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

Le fer du centre catalytique des cytochromes P450, sous forme ferreuse, fixe une molécule d'oxygène. Le complexe oxygéné est en équilibre avec une forme iso électronique dans laquelle le dioxygène récupère un électron et passe à l'état de superoxyde [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [JUNGBLUTH G., 2008].

$$\text{Porph } (Fe^{3+})O \leftrightarrow \text{Porph } (Fe^{4+})O^{\bullet -} \leftrightarrow \text{Porph}^{\bullet +}(Fe^{4+})O^{2-}$$

Les fuites d'espèces réactives de l'oxygène à partir du cycle réactionnel des cytochromes P450 sont continues, elles sont inhérentes à leur fonctionnement [JUNGBLUTH G., 2008].

g. Les cyclooxygénases

Ce sont des protéines héminiques qui catalysent la production de prostaglandine H_2 (PGH_2) à partir de l'acide arachidonique, précurseur instable des prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes). Il existe deux isoformes, COX-1 (cyclooxygénase constitutive) et COX-2 (cyclooxygénase inductible). COX-2 est importante dans le développement de la fonction rénale et favorise la production de prostaglandine au cours de l'inflammation. COX-1 est responsable de la synthèse de prostaglandines assurant des fonctions tissulaires physiologiques. Les cyclooxygénases sont localisées sur la membrane luminale du réticulum endoplasmique et sur les membranes interne et externe de l'enveloppe nucléaire. De nombreuses molécules telles que les phénols, les amines aromatiques, les polyènes peuvent être transformées en radicaux libres par les cyclooxygénases [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [JUNGBLUTH G., 2008].

h. La myélopéroxydase

Il s'agit d'une enzyme héminique retrouvée en grande quantité dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles et, à plus faible concentration, dans les monocytes. En effet, la myélopéroxydase représente 2 à 5% du pool protéique des neutrophiles. Elle est aussi retrouvée dans les lignées cellulaires leucémiques. Elle est capable d'oxyder un grand nombre de substrats, en transformant le peroxyde d'hydrogène en autres espèces réactives de l'oxygène telles que le dioxyde d'azote [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

i. Les monoxyde d'azote synthétases (NOS)

Elles catalysent l'oxydation de la L-arginine (R=NH) en présence de NADPH et de dioxygène pour former la L-citrulline (R=O) et le monoxyde d'azote $NO^{\bullet}$ comme suit :

$$R{=}NH + 3e^- + 3H^+ + 2\,O_2 \rightarrow R{=}O + 2H_2O + NO^{\bullet}$$

On distingue trois isoformes des monoxyde d'azote synthétases. La NOS neuronale est constitutive des cellules du système nerveux central. La NOS inductible est retrouvée au niveau du cytosol des macrophages, des hépatocytes, des polynucléaires neutrophiles, des cellules des îlots pancréatiques et des cellules endothéliales. Elle produit du monoxyde d'azote en réponse à un stimulus inflammatoire ayant pour origine l'action de cytokines pro-inflammatoires. La NOS endothéliale est constitutive de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales et les plaquettes. Comme dans le cas du cytochrome P450, les NOS sont susceptibles de produire du peroxyde d'hydrogène et du superoxyde. Ce dernier peut alors former du peroxynitrite en réagissant avec le monoxyde d'azote [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [JUNGBLUTH G., 2008].

j. Les sources exogènes d'espèces réactives de l'oxygène

Elles sont nombreuses. Citons, entre autres, les produits ménagers (eau de Javel contenant de l'acide hypochloreux HOCl et eau oxygénée contenant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2) pouvant être ingérés accidentellement chez le chien, les herbicides tels que le paraquat, les médicaments (antimitotiques), la pollution atmosphérique (les fumées de combustion émanant des industries et des véhicules contiennent des espèces réactives de l'oxygène telles que les oxydes d'azote), les rayonnements ionisants X et gamma.

Conclusion partielle :

Les sources de production des espèces réactives de l'oxygène sont donc très variées. La production de ces entités est inhérente au métabolisme des organismes aérobies. Les enzymes qui utilisent le dioxygène au cours de leur cycle catalytique sont des sources potentielles permanentes d'espèces réactives de l'oxygène.

C. Systèmes cellulaires de défense antioxydants

L'oxygène pouvant être potentiellement toxique, les organismes aérobies ont développé des mécanismes de défense antioxydants. Les antioxydants peuvent être synthétisés *in vivo* ou provenir de l'alimentation. De façon à maintenir, dans les conditions physiologiques, un équilibre vital entre la formation et la destruction d'espèces réactives, la cellule dispose de mécanismes antioxydants [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

1. Les mécanismes antioxydants

Halliwell définit un antioxydant comme *toute substance qui, présente à faible concentration comparativement à celle du substrat oxydable qu'elle est censée protéger, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat.* Le terme de « substrat oxydable » renvoie alors à la quasi totalité des composants cellulaires, incluant les protéines, les lipides, les carbohydrates et l'ADN [CHANDAN K. SEN, 1995].

Les systèmes antioxydants agissent selon différents mécanismes d'action [CHANDAN K. SEN, 1995] :

- ✓ en prévenant la formation des espèces réactives de l'oxygène,
- ✓ en empêchant leur action par :
  → la conversion des métabolites réactifs en molécules moins réactives ou inertes,
  → le renforcement de la résistance des cibles biologiques.
- ✓ en évitant la conversion d'espèces peu réactives de l'oxygène telles que $O_2^{\bullet}$ en formes plus délétères telles que $^{\bullet}OH$,
- ✓ en facilitant la réparation des dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène et l'expression de gènes codant pour les protéines anti-oxydantes,
- ✓ en créant un milieu favorable à l'action d'autres antioxydants (maintien du statut redox).

Un grand nombre de substances enzymatiques et non enzymatiques sont connues pour leur fonction anti-oxydante agissant notamment au niveau du muscle et du sang. La superoxyde dismutase, les catalases et la glutathion transférase jouent un rôle primordial dans le système cellulaire de défense antioxydant [CHANDAN K. SEN, 1995].

Chaque antioxydant joue un rôle unique et précis dans la cellule mais agit en complément des autres. Notons que le caractère lipophile ou hydrophile de certains antioxydants ne limite pas leur action à certains compartiments. Par exemple, les radicaux tocophéroxyl, localisés dans la membrane lipidique peuvent être réduits par l'acide ascorbique, localisée dans la phase aqueuse par affleurement du noyau chromanol à la surface de la membrane. Le statut physiologique d'un système biologique nécessite un équilibre entre antioxydants hydrophiles et lipophiles [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

2. Les acteurs enzymatiques de la défense anti-oxydante

a. Mécanisme global de la destruction des ions superoxydes et des peroxydes

Cette destruction est assurée par une action complémentaire de plusieurs enzymes. Dans un premier temps, l'ion superoxyde est simultanément réduit et oxydé par la superoxyde dismutase (SOD) pour former du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène (1). Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'ion superoxyde. Il est capable de quitter la mitochondrie avant de réagir avec d'autres molécules. Dans un second temps, le peroxyde d'hydrogène est converti en eau et en dioxygène par les catalases (CAT) ou réagit avec l'ion ferreux ou un autre métal de transition ionisé pour produire le radical hydroxyl (réaction théorique et controversée) (2), (3). L'ion ferrique ainsi formé peut être réduit par l'ion superoxyde pour reformer l'ion ferreux et du dioxygène (4). Le cycle est ainsi bouclé. En conséquence, même une faible concentration en fer ionisé suffit à catalyser la formation de grandes quantités de radicaux hydroxyl [STEVEN C., 2006].

$$2\ O_2^{\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{-\ SOD} H_2O_2 + O_2 \quad (1)$$

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{-\ CAT} 2\ H_2O + O_2 \quad (2)$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+} \quad (3)$$

$$O_2^- + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+} \quad (4)$$

b. La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est surtout localisée au niveau mitochondrial et dans le cytosol. Il s'agit d'une enzyme clef des processus antioxydants intracellulaires, molécule anti-oxydante très efficace au sein de la cellule supérieure. Elle assure la conversion du radical superoxyde en eau oxygénée comme suit :

$$O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet}$$

$$2\ O_2^{\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{-\ SOD} H_2O_2 + O_2$$

Dans la plupart des cellules de l'organisme des mammifères, on distingue deux isoformes de la superoxyde dismutase : la Mn-SOD, principalement retrouvée au niveau mitochondrial, et la CuZn-SOD, retrouvée dans le cytosol, le noyau et au niveau

mitochondrial. L'activité de la superoxyde dismutase est plus importante au niveau des fibres musculaires de type I et IIa. Une forme extracellulaire de cette enzyme, dépendante du fer et du cuivre, est retrouvée dans le plasma et les tissus [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

c. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPX) constituent le réservoir cellulaire de cystéine et contiennent toutes, dans leurs sous unités (1 ou 4 selon l'isoenzyme) un atome de sélénium. Elles détruisent le peroxyde d'hydrogène et la plupart des hydroperoxydes organiques dans le cytosol, le plasma et la membrane cellulaire [HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., 2002].

$$2\ H_2O_2 - GPX \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Au cours de son action anti-oxydante, le glutathion réduit (GHS) est oxydé en glutathion disulfide ou glutathion oxydé(GSSG). Puis, sous l'action de la glutathion réductase (GRD) et aux dépens du NADPH, le glutathion disulfide est réduite en GHS [CHANDAN K. SEN, 1995]. La glutathion réductase permet de restaurer le pool de glutathion réduit. En effet, l'accumulation de glutathion disulfide est toxique pour la cellule.

$$2\ GSH - \text{espèce réactive de l'oxygène} - GPX \rightarrow GSSG$$

$$GSSG + NADPH - GRD \rightarrow 2\ GSH$$

L'activité des glutathion peroxydases est plus importante au niveau des fibres musculaires de type I [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

d. Les glutathion S-transférases

Le glutathion est impliqué dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques pro-oxydants. Grand nombre d'entre eux sont métabolisés par conjugaison avec le glutathion réduit, réaction catalysée par les glutathion S-transférases (GST) [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

$$RX + GSH - GST \rightarrow RSG + HX$$

e. Les catalases

Les catalases (CAT) sont principalement des enzymes cytoplasmiques, localisées dans les peroxysomes et au niveau mitochondrial [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. Elles ont, pour cofacteur, le fer et agissent au niveau intra-érythrocytaire et au sein des cellules hépatiques.

Elles décomposent le peroxyde d'hydrogène ou l'utilisent dans l'oxydation du méthanol ou de l'éthanol [CHANDAN K. SEN, 1995].

$$2\ H_2O_2 - CAT \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$
$$AH_2 + H_2O_2 - CAT \rightarrow A + 2\ H_2O$$

De la même façon que les glutathion peroxydases et que la superoxyde dismutase, l'activité des catalases est plus importante au niveau des fibres musculaires de type I [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Au niveau de l'œil, la catalase joue un rôle très important dans la protection des tissus uvéaux antérieurs contre l'effet des radicaux libres de l'oxygène [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005].

f. Les thiorédoxines

Les thiorédoxines possèdent une fonction réparatrice des groupements thiol oxydés, en particulier des protéines intracellulaires, et détruisent le peroxyde d'hydrogène. Elles sont aussi impliquées dans la régénération de l'acide ascorbique oxydé. La classe des thiorédoxines regroupe la thiorédoxine, la thiorédoxine réductase et la thiorédoxine peroxydase [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

g. La glutarédoxine

La glutarédoxine est impliquée dans la protection et la réparation des thiols protéiques et non protéiques tels que le glutathion. Sa fonction se rapproche de celle des thiorédoxines [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

h. Les péroxyrédoxines

Les péroxyrédoxines sont des enzymes anti-oxydantes assurant la protection des protéines et des lipides contre les dommages induits par des agents oxydants. Elles seraient impliquées dans la régulation du phénomène d'apoptose, de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'expression des gènes. On les retrouve dans le cytosol, la mitochondrie, les peroxysomes et le plasma. Il existe plusieurs péroxyrédoxines mais toutes contiennent un résidu cystéine réactif situé en région N-terminale. Elles peuvent se substituer à l'action des peroxydases avec, pour donneurs d'électrons, la thiorédoxine ou le glutathion [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

i. La hème-oxygénase

La hème-oxygénase-1, ou protéine de choc thermique 32, dégrade l'hème de l'hémoglobine en fer en présence de NADPH et d'oxygène. Il y a production de monoxyde de carbone (CO). L'expression de cette enzyme est favorisée en cas de stress oxydant ou de stress thermique [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., McMILLAN L., GIBSON G. & al., 2005].

j. La paraoxonase-1

La paraoxonase est une enzyme identifiée au départ en tant que barrière protectrice contre les poisons organophosphorés. Il s'agit d'une enzyme antioxydante importante impliquée dans la pathogénie de nombreuses affections notamment cardiovasculaires et les cancers chez l'homme. La paraoxonase est capable d'hydrolyser les composés organophosphorés. Son appellation provient de sa capacité à hydrolyser le paraoxon, substrat

organopshosphoré et principal métabolite toxique d'un insecticide, le parathion [GOSWAMI B., TAYAL D., GUPTA N., MALLIKA V., 2009].

Il s'agit d'une enzyme à haute densité synthétisée dans le foie et sécrétée dans le sang où elle est exclusivement associée aux lipoprotéines de haute densité (HDL). Elle possède une fonction anti-oxydante basée sur l'hydrolyse de lipides oxydés biologiquement actifs retrouvés au sein de lipoprotéines de faible densité (LDL) et de cellules artérielles. La paraoxonase-1 protège les LDL et les HDL de l'oxydation et neutralise le peroxyde d'hydrogène et les phospholipides peroxydés au sein des lipoprotéines oxydées. Il existe différentes paraoxonases. Etant donné que les HDL sont les principales lipoprotéines retrouvées chez le chien, la paraoxonase-1 pourrait exercer une action anti-oxydante importante chez cette espèce [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J., 2009].

La capacité du sang à hydrolyser le paraoxon est souvent utilisée comme marqueur de l'activité enzymatique de la paraoxonase-1. L'activité de la paraoxonase peut être mesurée par dosages fluorométrique et photométrique. La concentration plasmatique en paraoxonase peut être mesurée grâce à des kits ELISA [GOSWAMI B., TAYAL D., GUPTA N., MALLIKA V., 2009].

La réalisation pratique de la mesure de l'activité de la paraoxonase est décrite dans la seconde partie de cet exposé.

3. Les acteurs non enzymatiques de la défense anti-oxydante

a. Composés antioxydants issus de l'alimentation

(1) Les antioxydants liposolubles

Ils agissent au niveau des membranes cellulaires plasmique et nucléaire et des organistes intracellulaires. Ce sont :

(a) Les vitamines E ou tocophérols

Les différentes formes de la vitamine E :

La vitamine E joue le rôle d'antioxydant *in vivo* et *in vitro*. La chimie de la vitamine E est relativement complexe. Le terme de vitamine E correspond à deux groupes, les tocophérols et les tocotriénols, comprenant chacun 32 stéréoisomères. La biosynthèse de la vitamine E ne s'effectue pas chez les animaux. L' α-tocophérol est la forme la plus active sur le plan biologique mais toutes les formes de la vitamine E ont une fonction anti-oxydante. L'isomère γ est la forme la plus active *in vitro* et est largement utilisé dans la fabrication des aliments pour animaux pour prévenir l'oxydation des lipides [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Les produits d'origine végétale constituent la source majeure de vitamine E, les éléments les plus riches étant les céréales et les huiles végétales [CUVELIER C. & al., 2003].

Métabolisme de la vitamine E :

La vitamine E circule dans la lymphe et le sang et est retrouvée en quantité importante au sein de différents types de lipoprotéines. Il existe une très forte corrélation entre le taux de tocophérol et la concentration totale en lipides ou le taux de cholestérol dans le sérum [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Fonctions de la vitamine E :

La vitamine E est retrouvée uniquement au niveau de la membrane cellulaire. Elle agit en association avec la glutathion peroxydase [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000]. Elle constitue le plus important destructeur de radicaux libres membranaires et lipoprotidiques en inhibant la peroxydation lipidique par rupture des chaines des radicaux peroxydes ou par capture des oxygènes singulets, fonction pour laquelle il n'est pas possible de la remplacer par des antioxydants synthétiques [PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001]. Elle préserve ainsi l'intégrité des chaines des acides gras polyinsaturés à longue chaine de la membrane des cellules et maintient ainsi leur bio activité [TRABER M.G, ATKINSON J., 2007]. L'α-tocophérol ArOH est le seul antioxydant capable de stopper la peroxydation lipidique ; il réagit avec les radicaux lipidiques peroxyl $LOO^{\bullet}$ pour former un hydroperoxyde lipidique LOOH et le radical tocophéryl $ArO^{\bullet}$ selon la réaction [SOFFLER C., 2007] :

$$LOO^{\bullet} + ArOH \rightarrow LOOH + ArO^{\bullet}$$

Il semble que la vitamine E constitue, au niveau des membranes cellulaires et subcellulaires, la première ligne de défense vis-à-vis de la peroxydation des phospholipides vitaux [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Chez l'homme, le métabolisme de la vitamine E apparaît jouer un rôle majeur dans la régulation hépatique des teneurs en autres vitamines [TRABER M.G, ATKINSON J., 2007]. Après avoir exercé son activité de capteur de radicaux libres, l'α-tocophérol peut être recyclé dans la membrane grâce à l'acide ascorbique (vitamine C) et à l'ubiquinol (coenzyme Q réduit), conférant en cela partie de leurs vertus antioxydantes indirectes à ces deux molécules [GRANDJEAN D., 2005]. Notons, cependant, que ceci a été démontré *in vitro*.

La vitamine E stimulerait la migration des neutrophiles vers les sites musculaires endommagés et, par conséquent, l'élimination des débris cellulaires et favoriserait le turnover des protéines [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

Chez l'homme, le muscle squelettique contient environ 30 à 50 nmol de vitamine E par gramme de poids vif, avec des différences considérables entre les types de fibres musculaires. Dans le cœur et le foie, la concentration en vitamine E avoisine 60 à 70 nmol/g [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. 90% de la quantité totale de l'organisme en vitamine E serait retrouvée au niveau du tissu adipeux [BLATT D., H., LEONARD S.W., TRABER M.,G., 2001].

Conséquences de carence en vitamine E :

Une déficience en Vitamine E entraine une diminution des réponses immunitaires [GRANDJEAN D., 2005]. Chez des chiens de race Beagle âgés, un apport alimentaire à raison de 2,010 g de vitamine E par kg d'aliment stimule les défenses immunitaires [STEVEN C., 2006].

Les signes d'une carence en vitamine E sont, pour l'essentiel, imputables à un dysfonctionnement des membranes résultant de la dégradation oxydative des phospholipides polyinsaturés membranaires.

(b) Les vitamines Q ou ubiquinones

La coenzyme Q est un antioxydant hydrophobe jouant un rôle fondamental au sein de la chaine de transfert d'électrons mitochondriale. La forme réduite de la coenzyme Q ou ubiquinol agit comme donneur d'électrons, prévenant ainsi l'initiation et la propagation de la peroxydation lipidique. Elle participe aussi au recyclage du radical α-tocophéroxyl en α-tocophérol [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

La coenzyme Q10 aurait des effets antioxydants intéressants en rapport avec la fonction cardiaque et avec la prévention de la maladie parodontale chez l'homme.

Notons, cependant, que la contribution de l'ubiquinol en tant qu'antioxydant *in vivo* reste incertain [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(c) Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux, présents en abondance dans les légumes verts et orangés, les fruits fortement pigmentés et certaines espèces de poissons. Les caroténoïdes, qui possèdent au moins neuf doubles liaisons, jouent le rôle d'antioxydants en inhibant les radicaux hydroxyl, les anions peroxyde et le peroxyde d'hydrogène. Cette fonction est réalisée par les caroténoïdes en sacrifiant aux radicaux libres leurs multiples doubles liaisons fortement réactives par transfert d'hydrogène, stabilisant de cette manière les produits réactifs. Les caroténoïdes protègent également les membranes cellulaires en stabilisant les radicaux oxygénés produits lorsque les granulocytes à activité phagocytaire subissent des chocs qui détruisent les pathogènes intracellulaires [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000]. Le β-carotène et le lycopène sont des exemples de caroténoïdes.

Le β-carotène est un précurseur de la vitamine A chez le chien. Il possède une activité antioxydante totalement indépendante de son rôle pro-vitaminique A ; il agit en désactivant l'oxygène singulet et possède la propriété de piéger les radicaux peroxyl.

Le β-carotène aurait une fonction pro-immunitaire [STEVEN C., 2006].

La lutéine (pétales de rose d'Inde) et la zéaxanthine constituent des antioxydants oculaires reconnus. Ils sont étudiés à l'heure actuelle pour leurs propriétés anticancéreuses, au même titre que la β cryptoxanthine de l'orange et les lycopènes extraits de la tomate [GRANDJEAN D., 2005].

(d) La taurine

La taurine est un acide aminé contenant du soufre. Elle contient un groupe acide sulfonique (SOOH) au lieu d'un groupe acide carboxylique. Elle n'est pas incorporée aux protéines de l'organisme de part sa structure. Ainsi, elle se retrouve dans un grand nombre de tissus sous forme d'acide aminé libre, notamment le cerveau, la rétine, le myocarde, les muscles squelettiques, le foie, les plaquettes, les leucocytes [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000]. Elle a, pour origine, l'alimentation du chien et le métabolisme de la méthionine et de la cystéine. Son rôle dans la défense anti-oxydante de la cellule, avec pour corollaire une meilleure stabilisation membranaire, a été mis en évidence, ainsi que son rôle sur l'homéostasie calcique et la croissance [GRANDJEAN D., 2005]. Cet acide aminé protège le cœur des conséquences de la reperfusion post-ischémique [GATE L., PAUL J., NGUYEN B., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

(2) Les antioxydants hydrosolubles

Ils agissent au niveau des fluides extracellulaires et du milieu intracellulaire. Ce sont :

(a) Les vitamines C ou ascorbates

L'acide L-ascorbique est l'antioxydant naturel hydrosoluble le plus abondant [CHANDAN K. SEN, MUSTAFA ATALAY, AND OSMO HÄNNINEN, 1995]. Elle agit en tant qu'agent réducteur [SOFFLER C., 2007]. Elle est oxydée en hydroascorbate [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. Elle est essentielle au maintien de la protection oxydative de la phase aqueuse des cellules [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002]. Elle constitue une substance antioxydante efficace du plasma humain [CHANDAN K. SEN, 1995]. Un large éventail d'espèces réactives de l'oxygène (les radicaux hydroxyl et peroxyl, l'anion superoxyde, l'acide hypochlorique, l'ozone), d'espèces réactives de l'azote (le peroxynitrite) et de radicaux dérivés d'antioxydants (l'α-tocophéroxyl, les radicaux urates) peuvent réagir avec l'acide ascorbique. Elle agit comme co-substrat pour la biosynthèse du pro collagène, des catécholamines et de la carnitine [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, elle participe à la régénération de la vitamine E dans la cellule dès lors que celle-ci a exercé sa fonction antioxydante.

Cependant, l'acide ascorbique peut agir en tant qu'antioxydant seulement en absence de métaux de transition sous forme libre. En effet, en présence de fer ou de cuivre sous forme libre (Fe^{3+} et Cu^{2+}) et en concentrations élevées, l'acide ascorbique favorise la production du radical hydroxyl [SOFFLER C., 2007]. Cela ne peut pas se produire en conditions normales, dès lors que les ions sont chélatés.

L'acide ascorbique a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine, où elle participe à la dégradation du peroxyde d'hydrogène [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005].

La teneur plasmatique physiologique en acide L-ascorbique est de 4 µg/ml chez le chien [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

(b) Les polyphénols

Un phénol est un composant qui contient un groupement –OH sur un anneau benzène. Les polyphénols possèdent plus de deux groupes aromatiques –OH [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. Ils sont présents dans de nombreuses plantes telles que le thé vert où ils sont associés à des tanins. Ils intègrent la famille des flavonoïdes (que l'on retrouve dans le brocoli, les oignons, la laitue) au rang desquels figurent de nombreuses molécules à haute valeur antioxydante [GRANDJEAN D., 2005].

Les polyphénols ont de nombreux rôles antioxydants ; ils inhibent la peroxydation lipidique et détruisent certaines espèces réactives telles que $OH^{\bullet}$ et $NO_2^{\bullet}$. Certains peuvent réagir avec l'ion superoxyde. Les phénols possédant deux groupes –OH adjacents ou d'autres structures chélatantes se comportent en chélateurs de métaux ionisés [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. Ils sont capables de participer à la réparation des dégâts oxydatifs survenant sur l'ADN et les protéines [DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., 2006]. Les polyphénols interrompent la propagation des réactions radicalaires et préviennent l'initiation de ces réactions par inhibition d'enzymes activatrices de l'oxygène [GRANDJEAN D., 2001].

Les fruits tels que la myrtille sont de bons antioxydants. Ils contiennent, en effet, des polyphénols et des flavonoïdes [DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., 2006].

Cependant, les phénols ne se comportent pas toujours en chélateurs de métaux ionisés. *In vitro*, certaines études auraient montré que des mélanges de métaux et de phénols pouvaient favoriser les dégâts oxydatifs causés sur l'ADN et les protéines (mais pas sur les lipides). Plusieurs études ont démontré les effets cytostatiques et cytotoxiques des flavonoïdes sur des cellules en culture [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(c) Les phytates

Les phytates, présents dans les céréales, les noisettes et les légumes, chélatent le fer et ralentissent son absorption et, ainsi, son potentiel pro-oxydant [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(3) Oligo-éléments minéraux cofacteurs enzymatiques

Certaines enzymes peuvent être synthétisées par l'organisme seulement si l'oligoélément est suffisamment présent. Le tableau suivant (Tableau 1) récapitule la correspondance entre certaines enzymes à activité antioxydante et leurs différents oligoéléments.

Tableau 1 : Les cofacteurs minéraux des principales enzymes antioxydantes

Cofacteur	**Enzyme antioxydante**
Sélénium	Glutathion peroxydase
Cuivre et Zinc	Superoxyde dismutase Cu-Zn-SOD ou SOD 1
Manganèse	Superoxyde dismutase Mn-SOD ou SOD 2
Fer	Catalase

[D'après HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]

Le sélénium :

Le sélénium agit comme cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase et constitue la seconde ligne de défense détruisant les peroxydes avant que ces derniers n'endommagent les membranes, après la vitamine E [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000]. La vitamine B6 augmente la biodisponibilité du sélénium pour cette enzyme [GRANDJEAN D., 2005].

Bien qu'une carence en sélénium ait été observée expérimentalement chez le chien (à l'origine de dystrophie musculaire, de troubles de la reproduction, d'une diminution de la consommation alimentaire, d'œdèmes sous-cutanés ou encore d'une minéralisation des reins), l'incidence de carence en sélénium n'a pas été décrite chez le chien et chez le chat [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Conjointement à la vitamine E, le sélénium prévient l'oxydation des acides gras polyinsaturés entrant dans la composition des membranes, et de ce fait, permet d'en maintenir l'intégrité, en particulier au niveau musculaire [STEVEN C., 2006].

Les effets anticancéreux du sélénium pourraient s'expliquer par son activité anti-oxydante via l'action des glutathion peroxydases, son effet pro-immunitaire, son effet dans la perturbation du métabolisme des substances carcinogènes, son effet inhibiteur sur la prolifération tumorale, le phénomène d'apoptose et l'angiogenèse [STEVEN C., 2006].

Le fer et le cuivre :

Ils sont essentiels pour la quasi totalité des organismes aérobies à la synthèse de protéines impliquées dans la respiration, le transport du dioxygène, la formation de $NO^{\bullet}$ et la défense antioxydante [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. Bien que ces oligo-éléments minéraux cofacteurs ne soient normalement pas considérés comme antioxydants en tant que tels, leur rôle dans la défense antioxydante cellulaire est bien établi [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Cependant, ces métaux sont potentiellement de dangereux pro-oxydants [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

b. *Les chélateurs endogènes de métaux de transition*

La transferrine :

Il s'agit d'une glycoprotéine qui assure la capture du fer et son passage dans la circulation. Elle est capable de fixer d'autres métaux de transition que le fer mais avec une moindre affinité [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

La céruloplasmine :

Elle permet l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} et facilite la capture du fer par la transferrine. Alors que les sels ferreux s'oxydent spontanément au pH physiologique pour produire des espèces réactives de l'oxygène, l'oxydation du fer ferreux par la céruloplasmine ne le permet pas [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

c. *Le système glutathion : glutathion réduit (GHS) et glutathion oxydé (GSSG)*

Il est vital pour l'organisme que le statut redox intracellulaire soit stable. En effet, de nombreuses enzymes fonctionnent avec des groupements thiols réduits (-SH). L'oxydation de ces groupements thiols peut alors mener à l'inactivation réversible ou irréversible de ces enzymes [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. On comprend ici l'importance du système glutathion dans le maintien de ce statut redox.

Principale source non protéique de groupement thiol, la ι-γ-glutamyl-ι-cystéinylglycine ou glutathion est un tripeptide jouant un rôle majeur dans le maintien du statut redox de la cellule et dans son système de défense antioxydante. Cette molécule est largement retrouvée au sein d'organes exposés à des toxines tels que le foie, le rein, les poumons et les intestins. *A contrario*, le glutathion n'est que très faiblement retrouvé dans les fluides corporels. Au sein de la cellule, le glutathion joue un rôle dans la synthèse protéique, la synthèse d'ADN et, plus généralement, dans la détoxification cellulaire [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

Au cours de son action antioxydante, le glutathion réduit GSH est oxydé en glutathion disulfide GSSG par la glutathion peroxydase (GPX). Le glutathion réduit ainsi le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques :

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPX} GSSG + 2\ H_2O$$

De plus, il agit comme destructeur de l'oxygène singulet et du radical hydroxyl ($OH^{\bullet}$). Enfin, il intervient dans la réduction des radicaux tocophérols, prévenant ainsi la peroxydation lipidique.

Le glutathion réduit peut être recyclé par la glutathion réductase (GRD) en présence de NADPH [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003] [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001]. Nous l'avons évoqué précédemment. La réaction suivante l'illustre.

$$GSSG + NADPH + H^+ \text{ - GRD} \rightarrow NADP^+ + GSH$$

Chez l'homme, la synthèse du glutathion réduit est principalement localisée dans le foie qui fournit 90% du glutathion réduit circulant. Le glutathion réduit peut transiter du foie vers d'autres organes tels que le muscle squelettique en situation de stress oxydant. En cas d'exercice prolongé, cette migration est sous influence hormonale, notamment sous influence du glucagon [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Les tissus sont capables d'importer le glutathion réduit mais aussi d'exporter le glutathion disulfide lorsqu'ils sont soumis à un stress oxydant [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Chez l'homme, une altération du métabolisme du glutathion est associée au développement de nombreuses affections dont des hépatites [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

La glande thyroïde produit de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène, intervenant dans l'iodation des résidus de thyronine. La glande thyroïde se protège des dommages oxydatifs grâce à l'action des glutathion peroxydases [STEVEN C., 2006].

d. Les autres thiols

La S-adénosyl-L-méthionine, la thioredoxine et d'autres molécules soufrées possèdent des rôles importants dans le métabolisme et les défenses antioxydantes [STEVEN C., 2006]. Les teneurs endogènes de ces entités étant faibles, il semblerait que leurs effets antioxydants, difficilement quantifiables, soient principalement exercés de façon indirecte.

L'acide α-lipoïque agit comme cofacteur des enzymes impliquées de la chaine respiratoire mitochondriale : la pyruvate déshydrogénase et l'α-kétoglutarate déshydrogénase. On parle de facteur mitochondrial, au même titre que l'acétyl-carnitine. L'acide α-lipoïque participe au recyclage d'autres antioxydants et module, à la hausse, les teneurs intracellulaires en glutathion réduit [STEVEN C., 2006]. De nombreuses études chez l'animal ont montré les effets antioxydants de l'acide lipoïque dans de nombreuses situations de stress oxydant. L'acide lipoïque agirait comme molécule antivieillissement [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

La capacité des rats à recycler la vitamine C dans leur hépatocytes diminue avec l'âge mais serait restaurée par une administration d'acide lipoïque et d'acétyl-carnitine [STEVEN C., 2006].

L'importance des dommages oxydatifs sur le cerveau de chiens et de rats augmente avec l'âge. Cette dégénérescence est associée, chez le rat, à une perte de la mémoire. L'administration d'acide lipoïque et d'acétyl-carnitine semble restaurer partiellement cette perte de mémoire chez le rat [STEVEN C., 2006].

La N-acétylcystéine est un analogue du glutathion, dérivé de la cystéine. Elle agit par divers mécanismes ;
- elle traverse les membranes cellulaires,
- elle reforme les stocks appauvris en glutathion,

- elle possède une action directe sur les espèces réactives de l'oxygène suivantes : le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl et l'acide hypochlorique,
- elle stimule la vasodilatation et inhibe l'agrégation plaquettaire,
- elle limite la formation de cytokines pro-inflammatoires [SOFFLER C., 2007].

La N-acétylcystéine peut être facilement reconvertie en cystéine, un important précurseur intervenant dans la synthèse cellulaire du glutathion [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Chez le chat, la N-acétylcystéine entraine une élévation des teneurs en glutathion réduit [STEVEN C., 2006].

La ι-carnitine est un précurseur de l'acétyl-carnitine et est impliquée dans le métabolisme des lipides. Certaines études indiquent que les dégénérescences organiques diverses liées à l'âge et attribuables aux dégâts causés par un stress oxydant sur les enzymes mitochondriales peuvent être corrigées par une supplémentation à base d'acétyl-carnitine en association avec l'acide lipoïque [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002].

e. L'acide urique

L'acide urique est produit au cours de la dégradation de composés puriques. Chez la plupart des mammifères excepté l'homme, il est dégradé par l'urate oxydase. Il possède une fonction antioxydante en inhibant l'oxydation de l'acide ascorbique catalysée par le fer. En effet, il capture le fer et inactive des espèces réactives de l'oxygène telles que l'acide hypochloreux, le radical hydroxyl et le dioxyde d'azote [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

f. La bilirubine

La bilirubine est un pigment biliaire endogène non hydrosoluble. Il s'agit d'un produit de dégradation de l'hème obtenu au cours d'une réaction catalysée par la hème oxygénase [DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., 2006].

Concernant sa fonction antioxydante, *in vitro*, la bilirubine peut dégrader les radicaux alkoxyl ($RO^{\bullet}$) et peroxyl ($RO_2^{\bullet}$) et l'oxygène singulet. La bilirubine est oxydée par certaines espèces réactives de l'oxygène en biliverdine, pouvant alors être recyclée par la biliverdine réductase. Le rôle antioxydant de la bilirubine a été démontré, initialement, par des expériences réalisées sur des cultures cellulaires. Par exemple, l'administration de bilirubine diminue les dégâts oxydatifs et les lésions tissulaires observés chez des rats atteints d'encéphalite expérimentalement induite [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

g. Les aminostéroïdes

Les 21-aminostéroïdes sont dérivés des glucocorticoïdes. Ils captent les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), les hydroperoxydes lipidiques et préviennent la peroxydation lipidique catalysée par le fer. Leur capacité à limiter la peroxydation lipidique a été mise en évidence chez le chien [SOFFLER C., 2007].

4. Régulation des systèmes de défense

Au sein d'un organisme, le niveau et la composition des systèmes de défense anti-oxydante varient d'un tissu à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre dans un tissu donné. Plusieurs auteurs suggèrent que les cellules souches adultes et embryonnaires sont exceptionnellement riches en systèmes antioxydants. Cette qualité semble diminuer avec la différenciation cellulaire. Les mécanismes antioxydants semblent se développer et gagner en efficacité à la suite d'une exposition à des espèces réactives et à certaines cytokines [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène devient excessive, l'organisme est soumis à un stress oxydant. Cependant, l'organisme semble capable de s'adapter à certaines situations chroniques de forte exposition aux espèces réactives de l'oxygène en stimulant l'expression des enzymes antioxydantes et en favorisant la réparation des dommages oxydatifs. Plus de 100 gènes seraient activés en réponse à l'exposition des cellules aux espèces réactives de l'oxygène [HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., 2002].

Conclusion partielle :

Les substances à pouvoir antioxydant sont donc nombreuses et certaines sont certainement encore méconnues à l'heure actuelle. Elles peuvent être aussi bien endogènes qu'exogènes. Il est important de souligner l'ambivalence de certains composés quant à leur action, tantôt pro-oxydante, tantôt antioxydante, en fonction des caractéristiques du milieu, de la présence d'autres entités biologiques et de leur concentration dans le milieu. On comprend alors ici la complexité et la fragilité de la balance antioxydants/espèces réactives de l'oxygène. Lorsque les systèmes antioxydants ne parviennent pas à limiter la production d'espèces réactives de l'oxygène, des lésions peuvent apparaitre sur les constituants cellulaires.

D. Conséquences du stress oxydant

1. A l'échelle cellulaire

Les conséquences du stress oxydant à l'échelle cellulaire dépendent du type cellulaire et de l'importance du stress considéré. On peut observer ;

- une prolifération cellulaire en réponse à un stress oxydant modéré ; les effets prolifératifs des espèces réactives de l'oxygène contribueraient à l'angiogenèse et à la fibrose dans la pathogénie de certaines affections chez l'homme.
- une adaptation cellulaire par régulation des systèmes de défense ; les cellules tolèrent en général un stress oxydant doux à modéré qui s'accompagne, le plus souvent, d'une augmentation des défenses antioxydantes.
- des lésions cellulaires par des dégâts causés sur les protéines, les lipides, les carbohydrates et les acides nucléiques.
- un phénomène de sénescence cellulaire ; il s'agit d'un état permanent de non division associé à des quantités importantes d'espèces réactives.
- un phénomène de mort cellulaire [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Les zones d'action des espèces réactives de l'oxygène :

Des espèces hautement réactives produites au niveau mitochondrial ont peu de chances de migrer vers le cytoplasme tandis que des espèces faiblement réactives, telles que le peroxyde d'hydrogène, peuvent diffuser vers le cytoplasme avant de participer à des réactions d'oxydoréduction [STEVEN C., 2006]. En effet, la zone d'action d'une espèce réactive de l'oxygène dépend de sa demi-vie. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène produit au niveau des cellules musculaires lisses de l'endothélium des vaisseaux a une demi-vie relativement longue par rapport à d'autres espèces réactives et présente une bonne diffusibilité, ce qui l'autorise à traverser une série de membranes pour atteindre la circulation sanguine où il pourra exercer sa fonction oxydante sur certaines macromolécules [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

Le sang interagit avec de nombreux organes et tissus et, par suite, avec de nombreuses sources d'espèces réactives. De plus, un grand nombre de substances oxydables se trouvent déjà dans le sang. Nous verrons, par la suite, que la mise en évidence de l'existence d'un stress oxydant passe, le plus souvent, par des investigations au niveau plasmatique et au niveau des cellules sanguines. Il existe un transfert bidirectionnel des espèces réactives de l'oxygène du tissu musculaire vers le sang jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

2. A l'échelle moléculaire

a. Rôle délétère des espèces réactives de l'oxygène

En l'absence de réponse antioxydante, un stress oxydant sévère ou prolongé entraine des perturbations majeures du métabolisme cellulaire [GRANDJEAN D., 2005].

Les dégâts causés par un stress oxydant dépendent du type cellulaire et de l'espèce réactive de l'oxygène mise en jeu, notamment sa concentration, sa demi-vie, sa localisation et le temps durant lequel elle est produite [FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., 2009].

Les espèces hautement réactives telles que le radical hydroxyl $OH^{\bullet}$ vont provoquer des dégâts sur la quasi totalité des molécules situées à proximité tandis que les espèces moins réactives telles que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 vont être capables de diffuser et d'agir plus spécifiquement sur certains groupes fonctionnels ou sur des molécules ciblées [FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., 2009].

Les formes réactives de l'oxygène peuvent initier des cycles de réactions radicalaires qui s'auto-entretiennent. Cela peut être à l'origine de nombreuses oxydations moléculaires touchant différentes entités. Nous les citerons successivement.

(1) Altération des lipides insaturés membranaires

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec les lipides, notamment ceux composant les membranes cellulaires. Il y a peroxydation de leurs constituants, les acides gras polyinsaturés. Les acides gras monoinsaturés, constitutifs des lipides membranaires, sont moins réactifs que les acides gras polyinsaturés et sont, en général, moins concernés par la peroxydation lipidique.

La peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires fragilise leur chaine carbonée qui finit par casser à l'origine d'une modification des échanges transmembranaires. La fluidité et la résistance membranaires sont diminuées. De ces destructions, vont naitre des catabolites tels que ;

- l'aldéhyde dimalonique, éliminé par voie urinaire,
- les pentanes, éliminés par voie respiratoire,
- les hydroperoxydes, éliminés dans le cytoplasme devenant disponibles pour la formation de nouveaux radicaux libres [GRANDJEAN D., 2005].

Mécanisme réactionnel de la peroxydation lipidique :

Dans un premier temps, le radical libre $R^{\bullet}$ (par exemple $OH^{\bullet}$) capte un atome d'hydrogène situé sur un groupe méthylène d'un acide gras polyinsaturé (1). Par la suite, le dioxygène réagit avec le radical carboné produit pour former un radical peroxyl lipidique, $LOO^{\bullet}$ (2), alors capable de capter un atome d'hydrogène à partir d'un second acide gras polyinsaturé pour former un hydroperoxyde lipidique, LOOH (3) Ainsi, la conversion d'un acide gras polyinsaturé peut générer la conversion d'autres acides gras polyinsaturés en hydroperoxydes lipidiques. On parle de propagation de la peroxydation lipidique. L'hydroperoxyde lipidique est le premier métabolite relativement stable de la peroxydation lipidique. Sous certaines conditions, lorsque la peroxydation lipidique est en permanence initiée, une réaction terminale limite l'étendue de cette chaine réactionnelle en produisant des métabolites non radicalaires (4) [ABUJA 2001].

$LH + R^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + RH$	(1)	INITIATION
$L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$	(2)	PROPAGATION
$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow L^{\bullet} + LOOH$	(3)	
$2\ LOO^{\bullet} \rightarrow$ métabolite non radicalaire	(4)	TERMINAISON

En présence de métaux de transition ionisés, un hydroperoxyde lipidique peut réagir et relancer la peroxydation lipidique de la façon suivante :

$$LOOH + Me^{n+} \rightarrow LO^{\bullet} + Me^{(n+1)+} + OH^{-} \qquad (5)$$

$$LOOH + Me^{(n+1)+} \rightarrow LOO^{\bullet} + Me^{n+} + H^{+} \qquad (6)$$

Les hydroperoxydes lipidiques, en présence ou en absence de métaux de transition ionisés, peuvent former une grande variété de métabolites tels que des aldéhydes à courte ou longue chaine et des phospholipides dont beaucoup peuvent être utilisés pour évaluer le degré de peroxydation lipidique d'un système [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

La peroxydation lipidique génère de l'acide dimalonique et des isoprostanes [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001]. En effet, *in vivo*, la peroxydation de l'acide arachidonique conduit à la formation de composants PGF2α-like ; les isoprostanes. Le peroxyde d'hydrogène stimule la biosynthèse des isoprostanes F2α. Cet aspect confirme le rôle de ce métabolite de l'oxygène dans l'initiation de la peroxydation de l'acide arachidonique, indépendamment des cyclooxygénases [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005].

Conséquences du stress oxydant sur la membrane érythrocytaire :

Les globules rouges se comportent comme des pièges à radicaux libres circulants et protègent ainsi les autres tissus et organes. Ils sont particulièrement exposés aux attaques radicalaires car ils traversent des milieux riches en substances pro-oxydantes et parce que les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites lors de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine. Les peroxydations des lipides membranaires ont des conséquences majeures pour cette cellule. La paroi est définitivement endommagée lors d'hémolyse peroxydative. Par comparaison avec les autres cellules, au sein de l'érythrocyte, l'activité des enzymes anti-oxydantes est élevée. De plus, l'érythrocyte détient la majeure partie de la capacité anti-oxydante non enzymatique du sang [PORTIER K., 2007]. L'érythrocyte est donc une cible majeure de la peroxydation lipidique. Une des conséquences du stress oxydant sur la membrane érythrocytaire est une altération de sa fluidité.

Cependant, d'autres facteurs que la peroxydation des lipides engendrée par les espèces réactives de l'oxygène peuvent être à l'origine d'une altération de la fluidité membranaire [PORTIER K., 2007] :

- la teneur en cholestérol, principal rigidifiant des membranes en conditions physiologiques. Elle augmente la viscosité et le degré d'ordre,
- des changements notables de la température corporelle,
- la formation d'un potentiel électrique à travers la bicouche membranaire.

Chez l'homme, l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL oxydées qui, une fois captées par des macrophages, forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardio-vasculaires. Contrairement à l'homme, le chien est moins concerné par l'implication du stress oxydant dans les affections cardio-vasculaires [GRANDJEAN D., 2005].

(2) Altération des protéines

Chimie des dommages protéiques observés :

La chimie des dégâts oxydatifs touchant les protéines est plus complexe que ceux observés sur l'ADN. En effet, au lieu de quatre bases et un sucre, il existe plus de vingt acides aminés intervenant dans la structure des protéines et capables de former des résidus d'oxydation [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

L'extrémité des chaines protéiques est réversiblement ou irréversiblement modifiée par des espèces radicalaires ou non radicalaires. Les modifications irréversibles, telles que la carbonylation de la lysine, l'arginine et la proline, l'oxydation du tryptophane ou les pontages protéiques sont en général associés à une perte complète de la fonction protéique amenant à l'altération des fonctions enzymatiques ou à l'agrégation de protéines [FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., 2009].

Catalysée par des métaux, l'oxydation convertit l'extrémité des chaines de résidus d'acides aminés en dérivés carbonyl. L'histidine, l'arginine, la lysine et la proline sont particulièrement sensibles à l'oxydation [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. De même, les acides aminés contenant un groupement thiol (cystéine et méthionine) sont facilement oxydés par des espèces réactives et par les métaux de transition ionisés. Citons, par ailleurs, la tyrosine et la phénylalanine qui peuvent réagir, entre autres, avec les radicaux $OH^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Il semblerait que, souvent, seule une petite partie du pool protéique de la cellule soumis à un stress oxydant soit endommagé [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Les conséquences de l'altération des protéines :

Les conséquences de l'altération des protéines sont multiples, principalement en raison de leur structure et de leur implication dans de nombreuses fonctions cellulaires.

Il est possible d'observer [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] :

- un dysfonctionnement des récepteurs cellulaires,

- un dysfonctionnement des anticorps,

- un dysfonctionnement des signaux de transduction et une perturbation des fonctions de régulation,

- un dysfonctionnement du transport protéique ; lorsque les protéines de fixation ou de transport des métaux de transition sont touchées, ces derniers sont libérés. Ils sont alors capables de renforcer les effets néfastes déjà observés par la formation du radical hydroxyl [GRANDJEAN D., 2005].

- une perturbation de l'activité enzymatique ; la dénaturation de protéines spécifiques du cytoplasme conduit à une chute de l'activité enzymatique cytosolique [GRANDJEAN D., 2005]. Citons l'exemple du peroxyde d'hydrogène qui inactive la superoxyde dismutase [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Devenir du pool protéique altéré :

Suite à une oxydation anarchique des acides aminés et des protéines du cytoplasme, les enzymes cellulaires et les protéines de transport ainsi dénaturées deviennent plus sensibles aux protéases, plus hydrophobes. Elles peuvent s'accumuler alors autour des cellules et s'associer aux lipides pour former des dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés.

L'oxydation protéique serait, en partie, responsable des lésions d'athérosclérose, d'ischémie-reperfusion et serait aussi associée au vieillissement [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

Certaines protéines oxydées pourraient être perçues comme « étrangères » par le système immunitaire, à l'origine d'un phénomène auto-immun [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Lorsqu'une protéine est altérée par l'action d'une espèce réactive, elle subit, le plus souvent, une action protéolytique (protéolyse réalisée par les enzymes hydrolytiques des lysosomes par exemple). Cette protéolyse est indispensable au bon fonctionnement cellulaire puisque l'accumulation de protéines de conformation incorrecte peut mener à la mort cellulaire. Mais, certaines protéines fortement oxydées résistent à l'action protéolytique et forment des agrégats [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(3) Altération de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. Elle détermine la synthèse des protéines par l'intermédiaire de l'ARN.

L'ADN reçoit 10 000 à 100 000 impacts quotidiens en provenance des dérivés toxiques de l'oxygène, à l'origine de lésions du matériel nucléaire. Ces lésions sont normalement immédiatement réparées par les enzymes intranucléaires.

Rappelons que l'ADN est composé de séquences de nucléotides. Chaque nucléotide est constitué de trois éléments liés entre eux ; un groupe phosphate, un sucre (le désoxyribose) et une base azotée (base purique ou pyrimidique).

L'inefficacité des systèmes de réparation des lésions :

L'inefficacité des réparations apparaît alors en cause dans l'émergence et le développement de processus tumoraux malins [GRANDJEAN D., 2005] [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. En effet, l'ADN altéré peut être spécifiquement réparé par action de l'ADN glycosylase [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999]. Mais, lorsque les systèmes de réparation sont débordés, il arrive que les cellules se mettent à répliquer leur ADN avant que les processus de réparation n'aient eu l'occasion d'agir sur la lésion. Ceci est à l'origine de l'apparition de mutations [LODISH, BALTIMORE, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, DARNELL, 1997] [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. Ainsi, si le degré de stress oxydant est trop élevé, la réparation de l'ADN laisse place à la survenue de phénomènes de mutagénèse et/ou de carcinogénèse.

Les conséquences du stress oxydant sur l'ADN :

L'oxydation de l'ADN initie des cascades lésionnelles associant des coupures de chaine, la formation de dimères, l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, la création de pontages entre protéines et nucléobases, responsables d'anomalies de la multiplication cellulaire, de la synthèse protéique et de transmission du message génétique. Les espèces réactives peuvent attaquer l'ADN par effet direct sur les bases puriques que sont l'adénine et la guanine, les bases pyrimidines que sont la thymine et la cytosine ou sur le désoxyribose. L'ADN est une entité stable mais il subit une décomposition chimique spontanée (perte de bases puriques, perte du groupe amine de la cytosine). Le stress oxydant accélère ces altérations spontanées [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Les espèces réactives de l'oxygène ne sont pas toutes en mesure d'altérer l'ADN. Des concentrations significatives en $O_2^{\bullet-}$, $NO^{\bullet}$, H_2O_2 ou en peroxydes organiques ne semblent pas réagir avec les bases de l'ADN ou de l'ARN. Cependant, $O_2^{\bullet-}$ et $NO^{\bullet}$ pourraient réagir avec

des radicaux formés après attaque de l'ADN par des espèces plus agressives [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyl $OH^{\bullet}$ en 8-hydroxy-2-deoxyguanosine altère l'ADN et conduit à des phénomènes de mutagénèse et de carcinogénèse GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

Les dégâts oxydatifs touchant l'ARN peuvent perturber la traduction de nouvelles protéines [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002].

Ainsi, les altérations causées par les espèces réactives de l'oxygène perturbent la réplication de l'ADN et la division cellulaire. Si les dégâts sont nombreux, cela peut conduire à la mort cellulaire.

(4) Effets sur les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères glucidiques constitués d'un certain nombre d'oses.

L'attaque radicalaire affecte en particulier les protéoglycanes (complexes de protéines et de polysaccharides) du cartilage. Cela participe activement au phénomène arthrosique [GRANDJEAN D., 2005].

Chez les sujets diabétiques, l'oxydation du glucose contribue à la fragilité des parois vasculaires et de la rétine [GRANDJEAN D., 2005].

Conclusion partielle :

Ainsi, le stress oxydant peut causer des dégâts moléculaires via de nombreuses voies qui s'imbriquent entre elles. Par exemple, l'ADN peut subir à la fois des attaques directes, à partir de $OH^{\bullet}$ mais aussi des attaques indirectes par fixation de sous-produits de la peroxydation lipidique tels que l'aldéhyde dimalonique. Les échecs de réparation de l'ADN ainsi lésé peuvent, par ailleurs, être dus à des attaques oxydatives observées sur des polymérases ou des enzymes de réparation [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

b. Aspect bénéfique des espèces réactives de l'oxygène

Le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans l'inflammation cellulaire et la bactéricidie :

Physiologiquement, les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle dans le phénomène inflammatoire, la prolifération cellulaire et l'apoptose [SOFFLER C., 2007]. En effet, le radical libre superoxyde $O_2^{-\bullet}$ interviendrait dans la prolifération fibroblastique [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. De même, la production importante d'espèces réactives de l'oxygène et la déshydratation cellulaire surviennent au cours des stades précoces de l'apoptose et de l'hémolyse [PETIBOIS C., DELERIS G., 2005].

De plus, les espèces réactives de l'oxygène interviennent dans l'activité bactéricide des cellules sanguines de la lignée blanche par oxydation des composants bactériens [CHANDAN K. SEN, MUSTAFA ATALAY, AND OSMO HÄNNINEN, 1995] [GRANDJEAN D., 2005]. En effet, le mécanisme phagocytaire est le premier volet du rôle bénéfique des espèces réactives pour l'organisme. Les macrophages produisent du peroxyde

d'hydrogène qui détruit les enveloppes bactériennes au cours de la phagocytose. L'action bactéricide peut s'observer directement ou indirectement via la formation d'$OH^{\bullet}$ au sein de la bactérie. La sensibilité variable des bactéries au peroxyde d'hydrogène réside probablement dans le fait qu'elles possèdent, entre autres, des systèmes de métabolisation du peroxyde d'hydrogène plus ou moins développés. Citons, par ailleurs, l'ozone qui aurait une activité bactéricide. Il semblerait que les anticorps catalysent la production d'ozone à partir de l'eau [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans la communication cellulaire :

Par ailleurs, les espèces réactives de l'oxygène peuvent être considérées comme des messagers intra et extracellulaires en stimulant la réponse de la cellule à de nombreux stress (stress oxydant, stress thermique, action des ultraviolets ou encore des xénobiotiques). Citons, par exemple, l'implication du radical superoxyde $O_2^{-\bullet}$ dans les phénomènes d'apoptose, dans la prolifération des cellules musculaires lisses et l'agrégation plaquettaire [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007] [GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., 2003].

Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'activer certains gènes (*c-fos, c-myc, c-jun*) codant pour des facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. Ils sont activateurs du NK-κB (facteur nucléaire κB) qui participe à la production de cytokines dont l'interleukine 2 et le TNF. Or, le TNF est impliqué dans l'angiogenèse, étape importante de la réparation tissulaire [CHANDAN K. SEN, MUSTAFA ATALAY, AND OSMO HÄNNINEN, 1995].

Conclusion partielle :

Ainsi, le rôle délétère des espèces réactives de l'oxygène est à nuancer. Il est important de comprendre que la présence de ces molécules n'est pas, pour autant, synonyme de stress oxydant et de dégâts oxydatifs. Cependant, dans ces certaines situations, notamment pathologiques, plusieurs études ont démontré l'existence d'un lien entre les dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène et le développement d'une affection.

3. Conséquences pathologiques du stress oxydant chez le chien – les maladies qui intègrent une composante radicalaire

Par leurs effets délétères sur les macromolécules, les espèces réactives de l'oxygène peuvent induire des altérations cellulaires à l'origine du développement d'états, pathologiques ou non mais variés. Par exemple, chez l'animal, le vieillissement naturel est associé à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène ou à un affaiblissement des défenses antioxydantes [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999] [HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., 2002].

a. Lésions de reperfusion

Les lésions de reperfusion sont des dommages tissulaires qui continuent de se développer après une ischémie et malgré le retour du flux sanguin. Pendant le phénomène d'ischémie, la chute du débit sanguin entraine une diminution de la fourniture en oxygène. Le continuum entre lésions ischémiques et lésions de reperfusion dépend de la sévérité et de la durée de l'ischémie [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001] [HERMES-LIMA M., ZENTENO-

SAVIN T., 2002]. Plus la période d'ischémie est prolongée et la reperfusion tardive, plus les dégâts seront irréversibles [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001]. Les conséquences vont du léger dysfonctionnement cellulaire à la nécrose [SOFFLER C., 2007].

Les espèces réactives de l'oxygène formées à l'origine des lésions de reperfusion peuvent être produites par différents mécanismes [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001] :

- par l'activité de la xanthine oxydase,
- au niveau de la chaine de transport d'électrons mitochondriale, à l'origine d'une production de $O_2^{\bullet-}$,
- au niveau neutrophilique ; il y a production de $O_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 grâce à l'action de la NADPH oxydase,
- au cours du métabolisme de l'acide arachidonique, stimulé par la reperfusion,
- au cours du métabolisme des catécholamines.

Au cours du phénomène d'ischémie reperfusion, les espèces réactives de l'oxygène produites sont essentiellement formées au niveau mitochondrial au cours de la phase précoce de reperfusion puis par les phagocytes activés au cours des phases suivantes [HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., 2002].

Au cours de l'ischémie, le déficit en oxygène limite la formation d'ATP par mécanisme aérobie. Il s'ensuit une accumulation d'AMP alors dégradé en inosine puis en hypoxanthine. La xanthine deshydrogénase est convertie en xanthine oxydase au cours de la période d'ischémie par une protéase dépendante du calcium. Lorsque les tissus sont perfusés de nouveau, la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique, utilisant l'oxygène comme cofacteur. Cela génère la formation de radical superoxyde. Celui-ci provoque des dommages oxydatifs immédiats ou participe à la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène. Les espèces réactives de l'oxygène stimulent indirectement le recrutement des neutrophiles et leur activation via la production de cytokines, de leucotriène B4 et du facteur d'activation plaquettaire. Or, les neutrophiles constituent une autre source d'espèces réactives de l'oxygène impliquées dans les lésions de reperfusion tissulaire. En effet, la myéloperoxidase neutrophilique produit de l'acide hypochlorique à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ions chlore. Ceci provoquerait des lésions vasculaires, des lésions des muqueuses, des fuites protéiques et la formation de thrombus [SOFFLER C., 2007] [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

b. Stress oxydant et cancérogénèse

Les radicaux libres contribuent fortement au processus de cancérogénèse par différents types d'action [GRANDJEAN D., 2005] :

- intervention dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes,
- genèse et cumul de lésions de l'ADN,
- amplification des signaux de prolifération,
- inhibition de certains gènes réputés suppresseurs de tumeurs.

Les modifications oxydatives affectant l'ADN, en particulier la 8-hydroxylation de la guanine (formant la 8-hydroxydeoxyguanosine), sont à l' origine d'une mutagénèse et ont été associées à certains états tels que le cancer et le vieillissement [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

c. *Les affections neurologiques dégénératives*

Les affections neurologiques liées à l'âge sont, entre autres, une réponse au cumul des altérations cellulaires causées par les espèces réactives de l'oxygène.

Chez l'homme, le système nerveux central est sensible au stress oxydant de part plusieurs aspects [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001] [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002] :
- les lipides membranaires des neurones sont en grande partie des acides gras polyinsaturés, substrats principaux des réactions de peroxydation lipidique,
- l'albumine du liquide céphalorachidien est présente en faible concentration,
- certaines aires du cerveau ont des teneurs élevées en fer,
- beaucoup de neurotransmetteurs sont oxydables,
- la fourniture en vitamine E du système nerveux central à partir du plasma est faible de part l'existence de la barrière hémato-méningée.

Mise à part la teneur élevée en fer de certaines aires cérébrales de l'homme, ces aspects sont transposables au chien. Il paraitrait donc cohérent de parler de sensibilité du système nerveux au stress oxydant chez cette espèce, même si les publications sur ce sujet se font plus rares.

Les lésions cellulaires oxydatives semblent intervenir dans certaines affections neurologiques dégénératives [GRANDJEAN D., 2005].

L'importance des dommages oxydatifs sur le cerveau de chiens et de rats augmenterait avec l'âge. Cette dégénérescence serait associée, chez le rat, à une perte de la mémoire [STEVEN C., 2006].

d. *Stress oxydant et affections oculaires*

L'œil est un organe relativement peu protégé du milieu extérieur. Il est constamment exposé aux radiations, à l'oxygène atmosphérique, aux produits chimiques environnementaux. Ces facteurs participent à la genèse d'espèces réactives de l'oxygène qui contribuent à la survenue de lésions oculaires. De plus, la rétine contient une grande quantité d'acides gras polyinsaturés, la rendant plus sensible à la peroxydation lipidique.

Dans l'œil, le peroxyde d'hydrogène est présent dans l'uvée antérieure et dans l'humeur aqueuse des mammifères. La catalase et la glutathion peroxydase sont retrouvées dans les tissus oculaires. Ces enzymes protègent les tissus de la chambre antérieure contre le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène. Des concentrations trop importantes en peroxyde d'hydrogène sont toxiques pour le cristallin.

Chez l'homme, la concentration en peroxyde d'hydrogène de l'humeur vitrée de patients atteints de cataracte apparaît deux fois supérieure à celle de patients non atteins.

Chez le lapin, des pressions intraoculaires élevées induisent une ischémie au niveau de la rétine. Des radicaux libres de l'oxygène sont alors produits. La capacité des espèces réactives de l'oxygène (notamment le peroxyde d'hydrogène) à modifier les réserves de neurotransmetteurs de nerfs sympathiques dans l'uvée antérieure et de nerfs glutaminergiques de la rétine renforce l'hypothèse selon laquelle les espèces réactives de l'oxygène joueraient un rôle dans la survenue de maladies oculaires telles que le glaucome [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005].

e. *Stress oxydant et insuffisance rénale chronique*

Les oxydants interviendraient dans la pathogénie de plusieurs affections rénales.

KARGIN et FIDANCI (2001) rapportent qu'une augmentation de la teneur plasmatique en acide dimalonique, une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la catalase est observée chez des chiens atteints d'affections rénales variées.

La concentration urinaire en acide dimalonique serait un puissant marqueur de la peroxydation lipidique rénale. Chez des chiens azotémiques, aucun dégât oxydatif n'est observé sur les érythrocytes mais l'existence d'un stress oxydant est bien réelle et son importance est mise en rapport avec celle du dysfonctionnement rénal [BURANAKARL C., TRISIRIROJ M., PONDEENANA S., TUNGJITPEANPONG T., JARUTAKANON P., PENCHOME R., 2009].

f. *Stress oxydant et diabète*

La corrélation entre stress oxydant et diabète semble bien établie chez l'homme. En effet, il est admis que des concentrations élevées en glucose dans les milieux extra- et intracellulaires induisent un stress oxydant [GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., 2003]. Un stress oxydant a été mis en évidence dans le diabète expérimental chez l'animal. La relation entre des concentrations élevées en glucose et l'existence d'un stress oxydant a pu être mise en évidence sur des cellules en culture (cellules endothéliales d'aorte d'origine bovine). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans la survenue d'un stress oxydant en présence de concentrations élevées en glucose : l'auto-oxydation du glucose, la glycation des protéines et la voie des polyols. La plupart des études rapportent des taux plasmatiques en TBARS plus élevés chez les patients diabétiques qu'ils soient de type 1 ou de type 2 comparativement à une population normoglycémique. Toutefois, l'intensité de ce stress semble dépendre du type de diabète et du contrôle de l'équilibre glycémique [DELATTRE J., BONNEFONT-ROUSSELOT D., BORDAS-FONFREDRE M., JAUDON M.,-C., 1999].

Cet aspect reste à démontrer chez le chien. Citons, simplement, que le glutathion réduit GSH apparait insuffisant dans la rétine de chiens diabétiques [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005].

g. *La théorie radicalaire du vieillissement*

Cette théorie a été avancée pour la première fois en 1956 par HARMAN, postulant que la production d'espèces réactives de l'oxygène causait des dommages cellulaires et que les pathologies liées au vieillissement pourraient être dues à une réponse cumulative face à ces dommages [STEVEN C., 2006].

Le stress oxydant constituerait un facteur causal et aggravant du phénomène de sénescence chez l'animal. Le vieillissement cellulaire serait le résultat d'un déséquilibre chronique de plus en plus important entre la production interne à l'organisme de molécules

peroxydantes, les défenses antioxydantes et les processus de réparation cellulaire. Les altérations cellulaires oxydatives s'accumuleraient avec l'âge.

HEAD (2002) a mis en évidence, chez des chiens âgés, l'existence de dégâts oxydatifs sur des lipides et des protéines [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002].

De multiples théories du vieillissement ont été proposées. Ces mécanismes restent très discutés.

Conclusion partielle :

Le stress oxydant apparaît être un facteur sous-jacent du développement de nombreuses affections. Les biomarqueurs du stress oxydant se situent bien en amont du phénomène pour pouvoir être considérés comme des marqueurs de prédiction de la survenue de ces affections [LYKKESFELDT J., 2007].

Les conséquences biologiques du stress oxydant varient selon la dose et le type cellulaire. Ainsi, un stress « léger » augmentera la prolifération cellulaire (phénomène inflammatoire) et l'expression de protéines d'adhésion. Un stress « moyen » facilitera l'apoptose tandis qu'un stress « violent » désorganisera la membrane cellulaire, à l'origine d'une lyse cellulaire immédiate [GRANDJEAN D., 2005].

E. Caractérisation du stress oxydant

1. Les difficultés inhérentes à l'exploration du stress oxydant

L'exploration du stress oxydant reste difficile. Cela s'explique par [GRANDJEAN D., 2005] :
- la fugacité des espèces radicalaires ; leur instabilité et leur durée de vie brève,
- le fait que ces espèces radicalaires soient localisées dans un type cellulaire et un nombre de cellules réduit.

Le dosage quantitatif direct des espèces réactives de l'oxygène est donc presque impossible. Il est nécessaire de se tourner vers une batterie de méthodes analytiques indirectes pour caractériser le stress oxydant. Plusieurs méthodes de laboratoire ont été développées pour doser des molécules biologiquement stables, produites au cours de l'action délétères des radicaux libres. Ces molécules constituent des marqueurs de la production de ces derniers au sein d'un système biologique. Si ces marqueurs se retrouvent en quantités plus importantes dans le système circulant ou au niveau tissulaire, cela suppose l'existence d'une production de radicaux libres en amont. Ces marqueurs sont spécifiques de chaque type de cible des radicaux libres [STEVEN C., 2006]. Par exemple, la 8 hydroxydéoxyguanosine est un marqueur de lésions de l'ADN et l'aldéhyde dimalonique et les TBARS sont des marqueurs de la peroxydation des lipides.

Pour tenter de quantifier l'importance d'un stress oxydant au sein d'un organisme, les méthodes de mesure utilisent des estimations directes ou indirectes des concentrations en oxydants et antioxydants. Etant donné le caractère souvent hautement réactif des composants recherchés, le recours à des équipements très spécialisés est souvent nécessaire [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010].

L'utilité des marqueurs est controversée dans la mesure où ils sont utilisés pour quantifier de façon indirecte les espèces réactives de l'oxygène, alors souvent formées à distance. Ils sont de réels marqueurs des événements oxydatifs mais ne permettent pas d'apprécier les mécanismes directs des phénomènes oxydatifs au sein des tissus cibles [STEVEN C., 2006].

Parmi les kits disponibles dans le commerce, le *reactive oxygen metabolites (d-ROMs) test et* le *biological antioxydant potential (BAP) test* ont été développés pour estimer les statuts oxydant et antioxydant d'un organisme [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010].

L'existence d'un stress oxydant n'implique pas automatiquement l'existence de dégâts oxydatifs. Il est donc important de distinguer les marqueurs du stress oxydant des marqueurs des dégâts causés par un stress oxydant [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Cette partie n'a pas pour but d'exposer l'ensemble des techniques de mise en évidence du stress oxydant. Nous nous limiterons à l'exposition des techniques les plus couramment utilisées, notamment celles utilisées au cours de notre étude expérimentale.

2. Voies d'exploration du stress oxydant

a. Principes de base concernant les techniques de dosage

(1) Spectrométrie, spectrospcopie et spectrophotométrie

La spectrométrie ou spectroscopie est l'étude expérimentale du spectre d'un phénomène physique, c'est-à-dire sa décomposition sur une échelle d'énergie ou toute grandeur se ramenant à une énergie. Ce principe correspond à une multitude de techniques expérimentales. On analyse, par spectroscopie, non seulement la lumière visible, mais aussi le rayonnement électromagnétique dans toutes les gammes de fréquences, les ondes élastiques comme le son ou les ondes sismiques, ou encore des particules. La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation, en phase gazeuse, de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge. Suivant le type d'ionisation utilisé, un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. Ainsi, en le comparant avec des banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule.

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée, plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Connaissant le spectre d'absorption d'une espèce chimique, on peut mesurer, à l'une de ses longueurs d'onde (là où l'absorption est maximale) les variations de l'intensité d'un faisceau lumineux traversant une même épaisseur de solutions de concentrations diverses.

(2) La chromatographie

La chromatographie est une technique physique de séparation d'espèces chimiques. L'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée). Chaque espèce se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases.

(3) La voltamétrie

La voltamétrie est une méthode d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. Elle permet d'identifier et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés (cations, certains anions, composés organiques) et, également, d'étudier les réactions chimiques dans lesquelles ces composés interviennent.

b. Caractérisation du statut pro-oxydant

(1) Méthodes directes

(a) Détection des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE)

Le seul moyen direct de détecter et de quantifier la présence de radicaux libres est le recours à la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique. Cette méthode peut être utilisée pour l'étude directe des radicaux libres au sein des tissus. On peut utiliser des agents de capture pour stabiliser les radicaux libres et les rendre plus facilement détectables (méthode du « spin trap ») [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008].

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est aussi qualifiée de résonance de spin électronique (RSE). Il s'agit d'une technique de spectroscopie électromagnétique dans le domaine des micro-ondes. C'est une technique de mesure physique locale permettant d'obtenir des informations concernant la nature des espèces magnétiques en présence, ainsi que des informations sur leurs concentrations et les interactions magnétiques entre elles. Son principe est analogue à celui de la résonance magnétique nucléaire (RMN), à la différence près qu'en RPE, ce sont les spins des électrons qui sont excités plutôt que les spins des noyaux atomiques. La RPE est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique. Grâce à spécificité et sa grande sensibilité, elle permet une détection directe des espèces magnétiques caractérisées par la présence d'un électron non apparié sur leur couche de valence. Un spectre de résonance magnétique peut théoriquement s'obtenir, soit en fixant le champ magnétique statique et en faisant varier la fréquence du champ micro-onde, soit en faisant l'inverse. En pratique, la plupart des spectrophotomètres fonctionnent en permettant la variation du champ magnétique alors que la fréquence est fixée. Les spectres obtenus par RPE représentent la variation de l'absorption en fonction du champ magnétique statique pour une fréquence fixée. Chaque signal ainsi enregistré est caractéristique de l'élément magnétique en présence et des interactions auquel cet élément participe. Ces informations s'obtiennent à

partir de la valeur du champ de résonance, de l'aire en dessous de la courbe d'absorption et la mi-largeur à mi-hauteur de la courbe d'absorption [PORTIER K., 2007].

Cette méthode présente des limites ; elle manque de sensibilité pour de faibles concentrations en radicaux libres [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008].

(b) La chimioluminescence

Ce terme fait référence à l'émission de lumière observée au cours d'une réaction chimique au terme de laquelle une molécule excitée atteint un niveau supérieur d'énergie. Par exemple, l'oxygène singulet est un des produits les plus chimioluminescents intervenant dans la peroxydation lipidique. De faibles niveaux de chimioluminescence peuvent être détectés au niveau tissulaire et cellulaire ou sur des organes isolés. Les mesures doivent être associées à d'autres méthodes de caractérisation du stress oxydant. Cette technique a l'avantage d'être non invasive et de fournir un suivi continu [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

(2) Méthodes indirectes

(a) Les méthodes spectroscopiques

Les hydroperoxydes lipidiques sont considérés comme les produits initiaux des attaques des espèces réactives de l'oxygène sur la membrane cellulaire [ASHTON T., YOUNG I.S., PETERS J.R., JONES E., JACKSON S.K., DAVIES B. & al., 1999]. Ces hydroperoxydes présentent un pic d'absorption à 234 nm [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

(b) Mesure de la plasticité membranaire érythrocytaire par résonance paramagnétique électronique (RPE)

La capacité des érythrocytes à se déformer dans le flux sanguin est une caractéristique essentielle à leur fonction et à leur survie [BRUN JF., CONNES P., VARLET-MARIE E., 2007]. Comme vu précédemment, les acides gras de la membrane plasmique peuvent être cible des radicaux libres, et notamment les acides gras de la membrane érythrocytaire. Cette attaque des acides gras par les radicaux libres va modifier la structure de la membrane érythrocytaire à l'origine d'une modification de sa dynamique et d'une destruction potentielle des érythrocytes (hémolyse) [SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., KOCER G., OZKAYA Y.G., YESILKAYA A. et al., 2005]. L'objectif de cette technique est de mettre en évidence cette altération de la fluidité. Précisons que, sur les intervalles de temps utilisés pour la mesure de la fluidité membranaire par RPE (intervalles de temps restreints), il semble que seuls les radicaux libres puissent agir sur la fluidité membranaire. En effet, d'autres facteurs peuvent influer sur la fluidité membranaire, tels que le cholestérol, mais leurs effets s'observent à plus long terme.

Il existe plusieurs méthodes de mesure de la fluidité membranaire. On distingue trois niveaux d'analyse [PORTIER K., 2007] ;

→Le niveau microscopique qui permet d'obtenir des renseignements sur les atomes et les molécules constitutifs des lipides ; ce niveau est analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit d'une méthode spectroscopique fournissant des informations très

fines sur la coordination, la mobilité et l'environnement électronique immédiat des noyaux observés. Il est ainsi possible de remonter à la structure moléculaire du composé étudié et la symétrie de la phase dans laquelle il est inséré. La lecture des raies observées permet d'évaluer les échanges chimiques, un changement d'état ou les interactions avec d'autres noyaux.

→ Le niveau macroscopique correspondant à la formation de domaines lipidiques et pouvant être atteint par des mesures calorimétriques ou mécaniques.

→ Le niveau submacroscopique permettant une approche globale de la fluidité membranaire via des techniques de fluorescence ou de résonance paramagnétique électronique (RPE).

La RPE consiste en l'analyse du mouvement de l'électron. Une sonde moléculaire (acide gras susceptible de venir se glisser dans la couche phospholipidique membranaire) est introduite dans la membrane. Il s'agit d'un composé de synthèse, complètement stable. Par ses mouvements et sa distribution spontanée, il donne une moyenne des détails microscopiques et le niveau de fluidité lipidique de la membrane. Cela permet de mettre en évidence une éventuelle rigidité membranaire érythrocytaire.

La description de la technique à proprement parlée est détaillée dans seconde partie de ce travail.

(c) Mesure des alcanes expirés

La dégradation des sous produits de la peroxydation des lipides produit des hydrocarbures ; de l'éthane et du pentane que l'on retrouve dans les gaz expirés. L'éthane est considéré comme le marqueur le plus fiable du stress oxydant [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005]. Le principe de cette technique réside dans le fait qu'il est possible de collecter l'air expiré contenant ces hydrocarbures dans des sacs. Le dosage des hydrocarbures est alors ensuite réalisé par chromatographie gazeuse ou spectroscopie laser [CHANDAN K. SEN, MUSTAFA ATALAY, AND OSMO HÄNNINEN, 1995]. Chez l'homme, KANTER 1993 a montré que la teneur en pentane des gaz expirés au cours d'un effort prolongé augmentait proportionnellement au travail réalisé [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 2005].

La réalisation de cette technique est délicate étant donné les risques de contamination par des gaz atmosphériques (source de nombreux artéfacts).

Cette technique est plus délicate à mettre en œuvre chez le chien. En effet, elle passe par l'utilisation d'un masque à disposer sur le chanfrein de l'animal. Cette manipulation n'est pas toujours supportée par ce dernier.

(d) Teneurs plasmatique et urinaire en aldéhyde dimalonique (MDA)

Origines du MDA :

L'aldéhyde dimalonique est un sous produit de la peroxydation des lipides. L'oxydation des acides gras polyinsaturés constitue la source première d'aldéhyde dimalonique *in vivo*. Il existe d'autres voies de production, moins importantes, où l'aldéhyde dimalonique est un sous produit de la genèse de radicaux libres initiée par les radiations ionisantes ou un sous produit de la biosynthèse des prostaglandines.

Il est libéré dans le plasma lors de dégâts membranaires [BURANAKARL C., TRISIRIROJ M., PONDEENANA S., TUNGJITPEANPONG T., JARUTAKANON P., PENCHOME R., 2009]. Il n'apparaît donc pas en première ligne des réactions radicalaires. Il est utilisé comme marqueur plus tardif des dégâts causés par les espèces réactives de l'oxygène [ASHTON T., YOUNG I.S., PETERS J.R., JONES E., JACKSON S.K., DAVIES B. & al., 1999].

Différentes techniques de dosage :

L'aldéhyde dimalonique est dosé depuis les années 1960. Différentes techniques de dosage sont utilisées par les laboratoires en raison de leur simplicité et de leur faible coût. L'introduction de nouvelles techniques ces dernières années a permis un meilleur contrôle de la formation d'aldéhyde dimalonique au cours de la préparation de l'échantillon et l'obtention de résultats plus homogènes.

La mesure des concentrations plasmatique ou urinaire en aldéhyde dimalonique peut être réalisée en utilisant une méthode basée sur une réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). La concentration plasmatique est exprimée en nmol/ml et la concentration urinaire en nmol/g [BURANAKARL C., TRISIRIROJ M., PONDEENANA S., TUNGJITPEANPONG T., JARUTAKANON P., PENCHOME R., 2009]. Il s'agit d'une méthode simple et largement utilisée mais elle manque de spécificité (dosage simultané d'autres aldéhydes) et n'est pas exempte d'artéfacts.

Une autre méthode consiste à faire réagir l'aldéhyde dimalonique avec la N-méthyl-2-phénylindole à 45°C. Il se forme de la carbocyanine, qui possède un pic d'absorption à 586 ηm, détecté par un spectrophotomètre UV [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Une étude réalisée chez l'homme par ASHTON en 1999 recourt à un dosage de l'aldéhyde dimalonique par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection fluorométrique à partir de plasma isolé sur tube EDTA [ASHTON T., YOUNG I.S., PETERS J.R., JONES E., JACKSON S.K., DAVIES B. & al., 1999] [LYKKESFELDT J., 2007].

L'aldéhyde dimalonique peut aussi être quantifié par d'autres techniques que la spectrophotométrie et la chromatographie liquide haute performance. Il existe une technique, la spectrométrie de masse en phase gazeuse, basée sur la formation d'un produit dérivé du pentafluorophenylhydrazine : l'adduit stable N-pentafluorophenylpyrazole. Cette technique permet de quantifier quelques fentomoles d'aldéhyde dimalonique. L'aldéhyde dimalonique peut aussi être quantifié par une méthode spécifique et sensible : l'électrophorèse capillaire. Cependant, bien que ces techniques semblent plus performantes que celles citées ci-dessus, elles n'ont pas été utilisées avec suffisamment de recul, probablement parce qu'elles nécessitent de recourir à un équipement coûteux et à un personnel spécifique hautement qualifié

Artéfacts et biais de mesure :

Chaque minute d'hémolyse au sein d'un prélèvement augmenterait notablement la quantité d'aldéhyde dimalonique plasmatique par libération de fer qui favoriserait l'oxydation lipidique, principalement sur des prélèvements en conditions acides [LYKKESFELDT J., 2007].

Conclusion partielle :

L'aldéhyde dimalonique peut être considéré comme un outil intéressant pour la mise en évidence de dégâts lipidiques, en particulier lorsque sa teneur est mesurée par des méthodes fiables telles que la chromatographie liquide haute performance [LYKKESFELDT J., 2007].

(e) Quantification de la production d'hydroperoxydes lipidiques

Il est utile de distinguer les méthodes qui mesurent la quantité totale de peroxydes de celles qui permettent la séparation des différents peroxydes [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

→ Le **dosage des métabolites réactifs de l'oxygène (*ROMs* pour *reactive oxygen metabolites*) par le *d-ROMs test*** est une technique permettant de quantifier les hydroperoxydes dans leur globalité. L'objectif est de quantifier des métabolites réactifs de l'oxygène (ROMs) : les hydroperoxydes (ROOH). Ce test a été développé par un chimiste Italien, Mauro Caratelli. Il est actuellement considéré comme la méthode de référence pour la mesure du statut global oxydant. Cependant, la technique utilisée (colorimétrie) n'est pas appropriée en analyse de routine car la méthode est complexe et requiert une assistance technique spécifique [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010].

Nous l'avons déjà cité dans le paragraphe consacré à la définition du stress oxydant : les métabolites réactifs sont plus stables que les espèces réactives de l'oxygène et peuvent être plus facilement quantifiables [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010]. Les hydroperoxydes sont générés par l'oxydation de plusieurs molécules telles que les lipides, les acides aminés, les peptides, les protéines et les nucléotides. Le *d-ROMs test* utilise le principe de la réaction de Fenton ; en présence d'un tampon acide, au sein d'un prélèvement biologique, un métal sous forme ionisée (fer ou cuivre) catalyse la dégradation des hydroperoxydes en nouvelles espèces radicalaires telles que les radicaux hydroperoxyl (ROO+) ou alkoxyl (RO+). Ces derniers réagissent alors avec un indicateur coloré, la N, N-diethyl-paraphenylendiamine à 37°C [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010]. Il se produit une réaction colorimétrique à l'origine d'un substrat de couleur rosée identifiable par photométrie à 505 nm. La concentration en métabolites réactifs est alors directement proportionnelle à l'intensité de la couleur observée, en accord avec la loi de Lambert-Beer.

PASQUINI a validé ce test pour l'espèce canine en 2008. Les résultats sont exprimés en unités Caratelli [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010].La norme se situe entre 67,1 et 91,5 CARR U (une unité Caratelli correspond à 0,08 mg de peroxyde d'hydrogène par dL, TROTTI 2002).

Les utilisateurs de ce test rapportent un manque de sensibilité. Ce test ne permet pas de quantifier les produits finaux issus des dommages causés par le stress oxydant tels que l'aldéhyde dimalonique mais permet d'évaluer le statut pro-oxydant en estimant la production potentielle d'espèces réactives de l'oxygène [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

→ D'autres méthodes utilisent des enzymes qui dégradent les peroxydes et dont l'activité est évaluée par un système de révélation colorimétrique. Il est possible d'identifier et de quantifier les différentes classes de peroxydes par chromatographie liquide haute performance. Les concentrations en hydroperoxydes obtenues dépendent de la méthode et de l'appareillage utilisés.

(f) Détection des isosprostanes

Il s'agit de produits de l'oxydation de l'acide arachidonique. Ce sont des marqueurs spécifiques de la peroxydation lipidique [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001]. Les isoprostanes sont des marqueurs relativement fiables des lésions dues au stress oxydant *in vivo* et *in vitro* [OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., 2005]. Des techniques ont été développées pour détecter les isoprostanes et leurs métabolites dans le plasma et les urines, même à de très faibles concentrations. Les techniques les plus fiables utilisent la chromatographie gazeuse ou la chromatographie liquide haute performance.

Attention, cependant, les isoprostanes ne sont pas des biomarqueurs idéaux. Parfois, il se produit une peroxydation lipidique artéfactuelle, d'autant plus importante que les prélèvements de plasma ne sont pas correctement conservés. Ce phénomène ne s'observe pas pour les prélèvements d'urine [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(g) Détection des carbonyles protéiques

Les carbonyles protéiques reflètent les dégâts oxydatifs infligés aux protéines. L'oxydation des résidus amino-acides des protéines peut former des produits contenant des groupes carbonyles. Ces groupes carbonyles peuvent être détectés après réaction avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine. Les carbonyles sont détectés par spectrophotométrie, par des techniques ELISA. Cependant, certains carbonyles libérés par la fragmentation de protéines peuvent être perdus au cours du processus. De nombreux laboratoires ont développé leur propre protocole. La détection des carbonyles protéiques peut être appliquée aux fluides corporels et aux tissus. Il s'agit d'une approche de l'étendue moyenne des modifications protéiques. La séparation et l'identification des protéines oxydées donnent souvent des informations plus précises [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

(h) Teneurs urinaire et tissulaire en 8-hydroxydéoxyguanosine

La 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OH-dG) est une base oxydée, marqueur des dommages oxydatifs non réparables survenant sur l'ADN par action des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote. Le dosage de la 8-OH-dG sert de marqueur du stress oxydant, reflètant l'hydroxylation de la guanosine. La 8-OH-dG peut être libre ou incorporée à l'ADN. Lorsqu'elle est libre, elle est rapidement filtrée par le rein alors que les fragments d'ADN restent dans la circulation sanguine. L'urine est une matrice plus appropriée que le plasma pour le dosage de la 8-OH-dG puisque cette dernière y est présente en concentrations plus importantes [StressMarq^{TM}. Biosciences Inc. [en ligne] [page consultée le 11 mars 2011]].

(i) La teneur en monoxyde de carbone (CO)

Le monoxyde de carbone est produit au cours de la transformation de l'hémoglobine en bilirubine, réaction catalysée par la hème-oxygénase et est retrouvé dans les gaz expirés. Il existe des appareils portatifs mesurant directement la teneur d'une enceinte en monoxyde de carbone. Ces appareils sont calibrés pour une teneur moyenne de 50 ppm de monoxyde de carbone dans l'air et sont capables de détecter des teneurs en monoxyde de carbone allant de 1 à 500 ppm. Entre plusieurs mesures, l'appareil doit être régulièrement rincé par un mélange de H_2/N_2. La teneur en monoxyde de carbone reflète l'activation de la hème-oxygénase, notamment au cours de l'exercice.

Dans la pratique, le monoxyde de carbone expiré est rarement détecté chez le chien. En effet, les teneurs en monoxyde de carbone expiré chez le Greyhound avant et après une course seraient trop faibles pour être détectées par cette technique [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005].

c. Caractérisation du statut antioxydant

(1) Capacités antioxydantes globales de l'organisme

(a) Pouvoir antioxydant global du plasma

La mesure du **Pouvoir antioxydant global du plasma** est aussi appelé ***BAP test ou FRAP Assay*.** Il s'agit d'un test spectrophotométrique mesurant le potentiel biologique antioxydant du plasma c'est-à-dire la capacité d'un échantillon de plasma à réduire les ions ferriques en ions ferreux. Le prélèvement de sang se fait sur tube hépariné [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010]. Le plasma est ensuite mélangé à une solution colorée (obtenue en mélangeant une solution de chlorure ferrique avec une solution d'un dérivé thiocyanate). Il se produit une décoloration dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 505 nm et qui est proportionnelle à la capacité du plasma à réduire les ions ferriques. Les résultats sont exprimés en µmol/L d'ions ferreux.

PASQUINI a validé ce test pour l'espèce canine en 2008. Chez le chien, la norme se situe entre 2069 et 2554 µmol/L. La norme humaine se situe, quant à elle, autour de 250 000 à 350 000 µmol/L. Il semble donc que le test, applicable en humaine, est inadapté chez le chien. Ce test permet de caractériser le pouvoir antioxydant global du plasma en évaluant simultanément la présence d'antioxydants endogènes et exogènes : l'acide urique, l'acide ascorbique, les protéines, l'α-tocophérol et la bilirubine [CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., 2010]. [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001]. L'inconvénient de ce test est qu'il mesure surtout l'acide urique. Il a l'avantage d'être facilement automatisable et reproductible. Les mesures sont peu influencées par l'albumine qui contribue de façon importante à la capacité antioxydante du plasma [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

(b) Mesure du potentiel de capture du radical peroxyl

Chez l'homme, la technique de mesure du potentiel de capture du radical peroxyl *ou TRAP* est basée sur la mesure du temps nécessaire à l'épuisement des antioxydants dans un échantillon soumis à un flux constant de radicaux peroxyl. Ce laps de temps est comparé à celui d'un échantillon contenant une concentration définie en un tocophérol quelconque, hydro- ou liposoluble. L'inconvénient de cette technique est qu'elle n'évalue pas la totalité des antioxydants plasmatiques lipophiles et hydrophiles. La valeur du potentiel de capture du radical peroxyl fait référence à la phase aqueuse ou à la phase lipidique du plasma [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

(c) Mesure de la capacité antioxydante par voltamétrie cyclique

Les antioxydants de faible poids moléculaire sont en général des agents réducteurs. Chez l'homme, la voltamétrie cyclique permet de mesurer la concentration globale en agents réducteurs. L'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité de nettoyer consciencieusement les électrodes entre chaque prélèvement de façon à éliminer les protéines et autres composants déposés en leur surface [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001].

(2) Les antioxydants cellulaires et circulants

(a) Vitaminémie E

Le dosage de la vitamine E est difficile. Certaines analyses ont pour seul but d'identifier l'α-tocophérol. D'autres visent la détermination de l'ensemble des tocophérols et tocotriénols, voire même celle de leur métabolites. Après un traitement de l'échantillon avec un solvant organique tel que l'éthanol, il faut procéder à une extraction, réalisée généralement avec de l'hexane. L'identification et la quantification sont réalisées principalement par chromatographie liquide de haute performance en phase normale ou en phase inverse.

Dans un premier temps, l'échantillon doit être traité par un solvant organique. Cette phase précède ou se fait simultanément à une phase de saponification ou à un processus d'extraction. Elle a pour but de rompre les structures dans lesquelles la vitamine E pourrait être intégrée (membranes, lipoprotéines, gouttelettes lipidiques,…), d'éliminer toute interférence avec d'autres molécules telles que les protéines et les hydrates de carbone qui ne sont pas solubles dans la phase organique et de créer un milieu dans lequel les analytes seront solubles. Ce solvant est généralement de l'éthanol. La saponification avant extraction est classiquement pratiquée en chauffant l'échantillon avec de l'hydroxyde de potassium, généralement dans de l'éthanol ou du méthanol. Après la phase de saponification, les éléments non saponifiables tels que la vitamine E sont extraits dans un solvant organique, alors que les sels d'acides gras, le glycérol et les autres substances restent dans la phase alcaline. Le solvant le plus fréquemment utilisé pour extraire la vitamine E est l'hexane. L'analyse de la vitamine E dans l'extrait brut est réalisée au moyen de techniques chromatographiques, notamment la chromatographie liquide haute performance. La chromatographie permet de séparer les molécules, il faut ensuite les détecter. Il existe plusieurs techniques de détection (détecteur UV, détecteur électrochimique, détecteur de fluorescence). La détection électrochimique est reconnue comme la plus sensible [CUVELIER C.et al., 2003].

(b) Vitaminémie C

De la même façon que le recours au rapport GHS/GSSG, le rapport de l'acide ascorbique (AscH) sur son produit d'oxydation, le déhydroascorbate (DHA) a été proposé comme indicateur de stress oxydant. Cependant, la quantification du DHA pose toujours problème. En raison de son caractère instable, notamment en présence de bicarbonate plasmatique, la mesure du rapport AscH/DHA n'est pas un paramètre fiable [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001]. Une oxydation artéfactuelle de l'acide ascorbique peut se produire au cours du prélèvement sanguin, sous l'effet de la lumière et d'une température supérieure à

4°C. C'est pourquoi il est délicat de mesurer, de façon fiable, les concentrations plasmatiques en acide ascorbique et hydroascorbate [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

(c) L'activité catalase

L'activité catalase peut être mesurée par la méthode de Aebi (1983) en suivant la diminution de l'absorbance du milieu réactionnel (tampon phosphate et extrait enzymatique) à 240 nm pendant deux minutes, après addition de peroxyde d'hydrogène. Elle est exprimée en kunits/g d'hémoglobine. Une unité de catalase est corrélée à la décomposition d'une micromole de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau par minute [BURANAKARL C., TRISIRIROJ M., PONDEENANA S., TUNGJITPEANPONG T., JARUTAKANON P., PENCHOME R., 2009].

(d) Le dosage du glutathion et la mesure du rapport GSH/GSSG

En cas de stress oxydant sévère, les mécanismes de réduction cellulaire sont dépassés ; le taux de glutathion disulfide (GSSG) augmente. On observe une amplification de l'oxydation du GSH en GSSG parallèlement à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Lorsque la concentration en glutathion disulfide formée dépasse les capacités de réduction de la glutathion réductase, du glutathion disulfide est retrouvé dans le plasma [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995] [CHANDAN K. SEN, 1995].

Pour le dosage du GSH dans les milieux biologiques, différentes techniques sont utilisables mais il n'existe aucune technique de référence. Citons, notamment, l'enzymocolorimétrie et la chromatographie liquide haute performance ou encore le kit GSH-400 (Oxis International SA) qui permet le dosage du glutathion réduit par une réaction chimique en deux étapes suivie d'une détection colorimétrique. La 4-chloro-7-trifluorométhylbenzopyridine réagit, dans un premier temps, avec l'ensemble des thiols réduits présents dans l'échantillon pour former des produits de substitution (thioéthers). Le passage en milieu alcalin entraîne une réaction de ß-élimination alcaline spécifique du thioéther obtenu avec le glutathion et conduit à la formation d'une thione chromophorique.

3. Perspectives et limites des techniques de laboratoire

En pratique, il existe un décalage entre les conclusions de la recherche clinique et l'application pratique des techniques de mesure, de part plusieurs aspects [ABUJA P., ALBERTINI R., 2001] :

- le coût élevé des certains équipements et/ou réactifs limite le développement de certaines techniques en analyse de routine,
- on note une variabilité non négligeable des résultats d'un laboratoire à l'autre,
- les outils certifiés pour la mesure des paramètres ne sont pas tous disponibles dans le commerce,
- plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence le même paramètre à l'exception de la vitamine E et de l'aldéhyde dimalonique. Par conséquent, il est difficile de définir des intervalles de référence,

- des désaccords sont parfois observés dans la littérature scientifique concernant l'importance ou l'interprétation de paramètres du stress oxydant.

Conclusion partielle :

Les méthodes de caractérisation du stress oxydant au sein d'un organisme sont donc extrêmement nombreuses. La mesure de l'aldéhyde dimalonique a été pendant très longtemps considérée comme le test de référence. Malheureusement, sa détection utilisant l'acide thiobarbiturique (TBARs) manque de spécificité et est sujette à de nombreux artéfacts. Depuis les années 80, des techniques plus fiables ont vu le jour. Actuellement, plus de 80 dosages sont potentiellement proposés. Seule une partie d'entre eux sont utilisables en routine clinique. Chaque méthode a ses spécificités et ses limites. C'est pourquoi il n'est pas envisageable de vouloir mettre en évidence un stress oxydant sur la base d'une seule analyse.

F. Lutte contre le stress oxydant

1. Prévention du stress oxydant

a. Prévention nutritionnelle du stress oxydant

(1) Les bénéfices d'une supplémentation nutritionnelle antioxydante

Les connaissances concernant les antioxydants nutritionnels se sont surtout développées ces dernières années. De nombreuses études ont révélé les bénéfices d'une supplémentation nutritionnelle en antioxydants chez plusieurs espèces [STEVEN C., 2006] [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002]. Par exemple, une étude réalisée par MILGRAM et al. (2002) a montré qu'une alimentation enrichie en un cocktail d'antioxydants et de cofacteurs mitochondriaux avait un effet positif sur la discrimination spatio-temporelle et l'apprentissage de chiens âgés. Ces apports atténueraient les effets délétères associés au vieillissement [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002].

Plusieurs aspects permettent de comprendre les bénéfices d'une supplémentation nutritionnelle antioxydante [GRANDJEAN D., 2005] ;

- ✓ L'élévation des teneurs alimentaires en acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels des séries oméga 3 et oméga 6, justifiées pour des raisons physiologiques au cours des dernières années dans les aliments pour chiens, accroit également le risque de fragilisation membranaire (radicaux libres destructeurs des doubles liaisons composant les AGPI),
- ✓ Les régimes traditionnels dits « ménagers » se révèlent systématiquement déficients en antioxydants, comparativement aux besoins de l'animal.
- ✓ L'émergence d'un surcroit pondéral est associé de manière proportionnelle à une augmentation de la consommation en oxygène de l'organisme avec pour corollaire une augmentation de la genèse de radicaux libres.

Il apparaît, alors, que toute maladie, de même que le vieillissement, responsable d'un dépassement des capacités défensives de la cellule, nécessite dès lors une supplémentation nutritionnelle anti-oxydante [GRANDJEAN D., 2005].

(2) Les antioxydants nutritionnels

L'alimentation contient un grand nombre de molécules nutritionnelles antioxydantes. Parmi celles-ci, citons les vitamines (E, C, β-carotène), les oligo-éléments (sélénium, zinc, cuivre, manganèse), mais aussi plus de 600 variétés de caroténoïdes et quelques 4 000 polyphénols et flavonoïdes recensés (dans le vin, le thé, les céréales, les fruits, certains légumes,…), des acides organiques, des phytates, des alcaloïdes, des dérivés soufrés (ail, oignon) ou encore des dérivés indoliques (choux) [GRANDJEAN D., 2005]. Les fruits et les légumes sont, pour la plupart, riches en flavonoïdes et polyphénols [STEVEN C., 2006].

L'indice ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity)* permet de mesurer les teneurs des aliments en antioxydants divers [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002]. Sa mesure est basée sur une méthode standardisée faisant appel au principe de l'inhibition de la fluorescence par les antioxydants contenus dans les végétaux. Toutefois, cette mesure ne tiendrait compte que des antioxydants hydrosolubles. C'est la raison pour laquelle une autre échelle peut être employée : la TAC (*Total Antioxydant Capacity*) qui quantifie, également, les antioxydants liposolubles.

Bien que d'interprétation délicate, le statut antioxydant du plasma constitue un assez bon reflet du niveau d'apports en antioxydants nutritionnels de la ration du chien [GRANDJEAN D., 2005].

L'apport nutritionnel en antioxydants vise essentiellement à :

- prévenir l'émergence et l'évolution des maladies à composante radicalaire,
- prendre en compte des poussées aiguës de stress oxydant lors d'effort physique intense et répété, hypoxie et/ou hypobarie d'altitude,
- prévenir les récidives,
- améliorer la réponse immunitaire.

Acide ascorbique :

Notons, dans un premier temps, que l'acide ascorbique et l'ester-C sont rapidement absorbés chez le chien [STEVEN C., 2006].

Le chien synthétise l'acide ascorbique mais l'utilité d'une supplémentation vitaminique C en situation de stress oxydant est bien établie chez cette espèce. Elle provoque une nette amélioration de la réponse organique et métabolique au stress d'effort chez le chien, à une posologie de 1 mg/kcal EM [GRANDJEAN D., 1991].

Les fruits, les légumes et les abats rouges constituent de bonnes sources d'apport en vitamine C [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Vitamine E :

Expérimentalement, la vitamine est rarement étudiée en tant que telle mais le plus souvent en association avec la vitamine C ou le sélénium [SOFFLER C., 2007].

Une carence en vitamine E peut entrainer des dommages tissulaires via l'action des radicaux libres à des niveaux comparables à ceux observés après un effort. Par conséquent, des apports adéquats en vitamine E sont essentiels pour maintenir l'intégrité des membranes au cours de l'exercice [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

Chez le marathonien, une supplémentation en vitamines E et C inhibe complètement la peroxydation lipidique induite par l'effort mais n'a pas d'effet sur les dommages infligés à l'ADN et sur les marqueurs des lésions musculaires [TRABER M.G, ATKINSON J., 2007].

Selon HAYEK (2000), une étude publiée par le National Research Council stipule que les besoins en vitamine E chez le chien sont de 22 UI/kg d'aliment (données basées sur un aliment contenant 0,1 ppm de Sélénium, moins d'1% d'acide lipoïque et 3670 kcal/kg d'énergie métabolisable). Les recommandations de l'AAFCO (*Association Of American Feed Control Officials)* évoquent 50 UI/kg d'aliment chez le chien avec un supplément de 10 UI par gramme d'huile de poisson par kilo d'aliment contenant des huiles de poisson. Selon HALL (2003), chez le chien, une administration d'aliment sec contenant des teneurs en vitamine E excédant 2000 UI/kg pendant 17 semaines n'a pas permis de mettre en évidence d'effets néfastes. L'AAFCO suggère un seuil à 1000 UI/kg d'aliment sec ou 45 UI/kg de poids corporel [STEVEN C., 2006]. Cependant, il n'existe aucune évidence scientifique de l'existence d'une toxicité de la vitamine E chez le chien [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Sélénium :

Chez le chien adulte, WEDEKIND (2002) recommande un régime contenant 0,10 mg de sélénium par kilogramme d'aliment. En tenant compte de la biodisponibilité du sélénium dans les aliments pour chiens, on recommande plutôt 0,35 mg/kg. L'AAFCO suggère une limite maximale de sécurité à 2 mg de sélénium par kg d'aliment [STEVEN C., 2006].

Acides gras essentiels :

Leur fourniture est essentielle dans la mesure où ils entrent dans la constitution des membranes biologiques.

Thiols (glutathion et acide α-lipoïque) :

L'administration d'acide lipoïque en tant qu'additif alimentaire augmente le rapport GHS/GSSG des leucocytes chez le chien [STEVEN C., 2006].

Superoxyde dismutase :

Chez le chien, le pH gastrique très bas de ce dernier détruit normalement la superoxyde dismutase. L'isolement récent d'une superoxyde dismutase naturellement protégée par des gliadines dans le melon et des essais cliniques conduits sur des chiens de traineau ont permis de mettre en évidence le bénéfice d'une supplémentation nutritionnelle en superoxyde dismutase protégée de melon vis-à-vis du stress oxydant induit au cours de l'effort. La fourniture en superoxyde dismutase permettrait une économie en autres antioxydants cellulaires et améliorerait, de ce fait, la réponse clinique des animaux au stress oxydant. En effet, la part des affections musculaires induites serait réduite [GRANDJEAN D., 2005].

Les antioxydants synthétiques, destinés à éviter l'oxydation des aliments :

Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisol (BHA) et l'éthoxyquine. Le BHT et le BHA sont utilisés dans l'alimentation humaine depuis 1954 et sont particulièrement efficaces en association. Aux Etats-Unis, l'usage de l'éthoxyquine est autorisé dans les aliments pour chiens depuis plus de 30 ans. Les antioxydants synthétiques sont plus efficaces que les antioxydants naturels et

supportent mieux la chaleur, la pression et l'humidité au cours du processus de transformation des aliments. De cette façon, ils protègent également les vitamines liposolubles A, D et E. La plupart des aliments en boites ne contiennent pas d'antioxydants et de nombreux aliments industriels secs utilisent des antioxydants vitaminiques [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Taurine :

Une supplémentation en taurine permettrait de limiter la peroxydation lipidique chez des rats diabétiques [GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., 1999].

Les antioxydants d'origine végétale : les caroténoïdes et le romarin :

Chez toutes les espèces, la plupart du β-carotène administré est converti en vitamine A (rétinol et acide rétinoïque) au niveau de la muqueuse intestinale. Chez le chien, le rétinol est transformé au niveau plasmatique en esters de rétinyl. L'administration orale de fortes doses de β-carotène (jusqu'à 250 mg/kg/j) ne semble pas générer de toxicité. Cependant, une décoloration du poil et une vacuolisation hépatique peuvent être observées [STEVEN C., 2006].

En association avec de la vitamine E et de la lutéine, la distribution de β carotène à des chiens placés en situation de stress oxydant induit par un effort extrême a permis de réduire les processus de dégradation oxydative de l'ADN et d'améliorer la résistance de lipoprotéines circulantes à une oxydation massive provoquée *in vitro* [GRANDJEAN D., 2005].

Le romarin fait l'objet de recherches dans le domaine de l'industrie des aliments pour animaux de compagnie. Bien que considéré depuis toujours comme un antioxydant naturel, il n'est pas utilisé sous sa forme originale, mais sous forme d'extrait raffiné afin d'en éliminer le goût et l'odeur [HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., 2000].

Oligoéléments minéraux :

A ce jour, aucune étude n'a pu démontrer d'augmentation du pool cellulaire enzymatique antioxydant par un apport alimentaire plus important en oligoéléments minéraux cofacteurs enzymatiques [GRANDJEAN D., 2005].

(3) Limites de l'apport nutritionnel en antioxydants

Les effets paradoxaux de la plupart des antioxydants sont de mieux en mieux connus. La plupart deviennent pro-oxydants s'ils sont administrés en excès. Par exemple, chez l'homme, une supplémentation excessive en vitamine E augmenterait le risque d'accident vasculaire cérébral hémorragique. Un apport simultané d'un ensemble de substances antioxydantes avec des activités complémentaires est préférable à un apport massif souvent préjudiciable d'une seule d'entre elles [GRANDJEAN D., 2005]. Par exemple, un apport excessif en vitamine E, en l'absence de suffisamment d'agents régénérants, provoque une accumulation de vitamine E oxydée, cette dernière étant quatre à cinq fois plus affine pour les acides gras polyinsaturés que $ROO^{\bullet}$ [CHANDAN K. SEN, 1995].

De plus, la distribution et la biodisponibilité des antioxydants sont importants à prendre en compte. Par exemple, plusieurs flavonoïdes et autres polyphénols ont une absorption et une solubilité limitée au niveau intestinal par rapport à d'autres composants comme la vitamine E qui est généralement bien absorbée. Même si les antioxydants sont généralement facilement absorbés, leur biodisponibilité dépend de plusieurs facteurs comme, par exemple, la consommation et la composition alimentaire. Par exemple, la vitamine E est moins bien absorbée lorsqu'elle est administrée en dehors des repas [STEVEN C., 2006].

Les transformations métaboliques peuvent altérer l'activité biologique ou la distribution d'antioxydants administrés oralement, de façon variable d'une espèce à l'autre. Par exemple, les chats éliminent l'acide lipoïque plus lentement que d'autres espèces [STEVEN C., 2006].

(4) La nécessité d'une stratégie nutritionnelle antioxydante raisonnée

Dans l'idéal, pour obtenir les meilleurs résultats thérapeutiques, les protocoles de supplémentation en antioxydants devraient utiliser tous les composants de la chaine antioxydante [CHANDAN K. SEN, 1995].

Une stratégie nutritionnelle antioxydante raisonnée intègre plusieurs principes :

- les antioxydants associés au sein d'un cocktail nutritionnel sont complémentaires ; les antioxydants hydrophiles préservent le contenu cellulaire tandis que les antioxydants lipophiles protègent les membranes. Il convient donc de se tourner vers une association de substances.
- les posologies doivent être adaptées à l'état de santé du chien.

Certaines situations justifient des apports plus importants en antioxydants nutritionnels :
- durant la phase de croissance pour limiter les retards de croissance et les troubles osseux induits,
- en période vaccinale ; la réponse immunitaire de l'animal apparaît plus intense sous supplémentation antioxydante,
- lors d'exercices physiques intenses ou lors de travail en conditions environnementales extrêmes chez le chien de sport et de travail pour prévenir l'apparition d'affections musculaires et digestives,
- chez l'animal vieillissant pour limiter le développement de lésions oxydatives au niveau du système nerveux central et la survenue de maladies dégénératives de type cancers, cataractes, insuffisance rénale ou diabète,
- lors d'anesthésie générale ou d'exposition à une pollution chimique.

Chez le chien, GRANDJEAN propose, au sein d'un complexe antioxydant optimal l'association de vitamine E, de vitamine C, de bétacarotène, de superoxyde dismutase et de polyphénols.

Les résultats d'une étude réalisée sur des chiens de race Beagle suggère que les antioxydants et les cofacteurs enzymatiques mitochondriaux agissent en synergie pour améliorer la fonction mitochondriale ayant pour conséquence une moindre production en

espèces réactives de l'oxygène et une minimisation de leurs effets [MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J. & al., 2002].

b. Prévention médicale du stress oxydant

Connue pour ses indications en gériatrie canine, la propentophylline y est valorisée pour améliorer l'oxygénation tissulaire et le maintien du débit cardiaque. Mais, ses actions cellulaires lui confèrent une fonction antioxydante. Elle participe à l'inhibition des phosphodiestérases et inhibe la recapture de l'adénosine extracellulaire par la cellule. Une étude réalisée sur des chiens de recherche-sauvetage en haute altitude recevant une dose quotidienne de propentophylline à raison de 5 mg/kg a permis d'évoquer plusieurs hypothèses [GRANJEAN D., 2004].

Cette molécule pourrait :

- prévenir le phénomène d'hypoxie myocardique,
- participer au maintien d'une bonne saturation du sang en oxygène et à une meilleure oxygénation cellulaire,
- jouer un rôle antioxydant cellulaire en participant à une épargne du potentiel antioxydant circulant de l'organisme.

La phényl-N-butylnitrone aurait des propriétés antioxydantes et anti-apoptique [GRANDJEAN D., 2005].

2. Perspectives concernant les antioxydants

De nouvelles molécules aux propriétés antioxydantes ont été récemment découvertes. Cependant, les attentes concernant les thérapies d'avenir se tourneraient vers le développement d'enzymes synthétiques (« synzymes »). La superoxyde dismutase synthétique et des catalyseurs de la dégradation du peroxynitrite sont en cours de développement. Une superoxyde dismutase de synthèse a été développée et commercialisée chez le chien (Oxstrin, Nutramx Laboratories, Edgewood, Maryland) [SOFFLER C., 2007].

Conclusion partielle :

La médecine humaine, bien plus avancée dans ce domaine que la médecine vétérinaire, essaie toujours de prouver le bénéfice clinique de la thérapie anti-oxydative. L'utilisation clinique des antioxydants chez l'homme et l'animal devient de plus en plus commune en regard de l'importance du stress oxydant. Cette tendance est favorisée par leur faible coût et le caractère minime des effets secondaires qu'ils génèrent. A terme, il conviendrait de démontrer de façon plus rigoureuse l'importance clinique du stress oxydant et les bénéfices éventuels d'une supplémentation nutritionnelle antioxydante spécifique à visée thérapeutique ou sportive [SOFFLER C., 2007].La notion de dose prend ici toute son importance. Elle pourrait expliquer l'échec relatif de certains essais et les effets délétères parfois observés.

III. Application à l'effort

Le travail intense et la compétition sont à l'origine d'un stress à la fois organique et psychologique, à la fois par l'homme et pour le chien. La connaissance des modifications physiologiques induites par l'effort physique peut lui permettre à l'homme de mieux comprendre, et de ce fait mieux préparer son chien à une compétition ou un travail, en prévenant de manière optimale les éventuelles lésions qui pourraient survenir. En effet, le développement des sports canins et l'augmentation du nombre et du niveau des compétitions ont conduit à l'émergence d'une véritable médecine sportive très spécifique [GRANDJEAN D., 2010].

A. Rappels de physiologie de l'effort

1. La définition de « l'exercice »

L'exercice peut être défini comme *toute activité physique accomplie avec une intensité suffisante, de l'ordre de 50 à 80% par rapport à celle d'un effort maximal et sur une durée suffisante* [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009]. Le type d'exercice le plus souvent utilisé en recherche chez l'animal est la course sur tapis roulant motorisé chez le rat.

On distingue l'effort sous maximal de l'effort maximal :

- l'effort maximal défini par une atteinte de la VO_2 max,
- l'effort sous maximal où la VO_2 max n'est atteinte qu'à 50 à 80%.

L'effort réalisé au cours d'une compétition de cross canin est un effort sous maximal.

2. L'énergie nécessaire au travail musculaire

L'exercice musculaire impose la transformation d'énergie chimique en énergie mécanique. La tâche essentielle du muscle est la resynthèse de la source d'énergie directe qu'est l'ATP. Cette resynthèse d'ATP se fera à partir de la phosphocréatine, des glucides, des lipides et des protides. On distingue deux types de fibres musculaires [GUILLET R., GENETY J., 1973].

a. Les différents types de fibres musculaires

- les **fibres de type II ou fibres rapides** ; elles ont un équipement enzymatique glycolytique développé. Elles sont dites à contraction rapide, phasique, support de contractions instantanées, de courte durée, intenses. Elles se fatiguent rapidement.

- les **fibres de type I ou fibres lentes** ; elles possèdent un équipement mitochondrial plus élevé, une concentration supérieure en enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des acides gras libres, des acides aminés et dans la chaine respiratoire. Elles tirent leur énergie de la dégradation oxydative des lipides de divers composés. Ce sont des fibres lentes, toniques, support de contractions répétées ou continues, pendant des périodes prolongées. Elles nécessitent un approvisionnement constant en substrat et en oxygène.

Les deux types de fibres sont le plus souvent rencontrés dans un même muscle ou leur répartition est irrégulière [GUILLET R., GENETY J., 1973].

b. Substrats utilisés chez le chien au cours de l'exercice

Les protéines, les hydrates de carbone et les lipides sont des substrats utilisés au cours de l'effort [GRANDJEAN D., 2010].

(1) Les glucides

Les glucides sont la principale source d'énergie pour le travail musculaire. Ils proviennent des réserves glycogéniques musculaires et hépatiques. Pour un exercice de longue durée, il y a resynthèse du glucose à partir de l'acide lactique et de l'acide pyruvique. Le foie est un organe clef dans le maintien d'une activité physique prolongée. Il est essentiel chez le chien de sport que les sources d'amidons utilisées soient hyperdigestibles. En effet, comparativement aux graisses, dont la valeur calorique est pratiquement deux fois et demi supérieure, les amidons augmentent notablement le volume de la ration pour des animaux qui requièrent de hauts niveaux énergétiques en raison de l'activité sportive.

Chez le chien de sport, la fourniture excessive de glucides non membranaires peut exacerber le stockage glycogénique, privilégiant, à l'effort, l'anaérobiose lactique. Inversement, la distribution au chien de sucres rapides avant un entrainement ou une compétition va être de nature à induire une hypoglycémie secondaire marquée en début d'effort, par réaction hyperinsulinique en retour.

(2) Les protéines

Le chien peut digérer de grandes quantités de protéines, particulièrement d'origine animale. Les protéines servent essentiellement à « construire » en permettant la synthèse des os, des muscles et des structures nerveuses. Les acides aminés ramifiés peuvent constituer 5 à 10% de l'apport énergétique oxydant musculaire.

(3) Les lipides

En ce qui concerne les lipides, ils constituent la source énergétique privilégiée du chien de sport en endurance. Ils sont très bien tolérés chez le chien. Au cours d'un exercice prolongé, le muscle prélève des acides gras dans ses réserves et dans le plasma. Le pool plasmatique d'acides gras libres est restreint mais son *turn-over* est rapide, d'autant plus si le sujet est entrainé.

Il existe deux familles d'acides gras indispensables ;

- la série des « oméga 6 » ; acides gras présents dans les huiles végétales surtout ; ils constituent les principaux « nutriments » du poil.
- la série des « oméga 3 » ; leur rôle est très important dans l'intégrité des membranes, le fonctionnement du système nerveux et du système immunitaire. Ces acides gras sont maintenant utilisés pour leurs vertus anti-inflammatoires et « oxygénatrices », par

amélioration de la diffusion de l'oxygène dans les cellules et la déformabilité des globules rouges [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

La mobilisation des réserves lipidiques à partir du tissu adipeux dépend d'un contrôle multihormonal (cortisol notamment). L'utilisation des acides gras libres plasmatiques paraît, quant à elle soumise à l'influence des relations entre métabolites relativement indépendantes des hormones. Lors d'efforts prolongés, l'apport énergétique alimentaire sera majoritairement assuré par les matières grasses.

c. Les voies de production d'énergie

Trois principales voies fournissent de l'ATP au muscle, en fonction de la durée de l'effort. Ces trois voies se succèdent dans le temps en fonction du type d'effort (Figure 17). On reconnaît donc trois voies de production d'énergie :

- **la voie anaérobie alactique** ;

Elle concerne les quelques secondes qui suivent le début de l'effort. La cellule reconstitue ses stocks d'ATP à partir de la phosphocréatine par transphosphorylation, sans avoir besoin d'oxygène. Cette voie ne produit pas d'acide lactique. La capacité de cette voie est limitée mais sa puissance est élevée. Il s'agit du système énergétique prépondérant lors d'efforts supra-maximaux ne dépassant pas quelques secondes. L'entrainement et le régime alimentaire n'ont pas d'influence sur cette voie [GOGNY M., SOUILEM O., 1995] [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

- **la voie anaérobie lactique : la glycolyse anaérobie** ;

Cette voie se met en place au bout d'une dizaine de secondes d'effort et est prédominante entre 30 et 60 secondes d'effort. Il y a utilisation du glucose sanguin puis du glycogène stocké dans le muscle, toujours sans consommation d'oxygène ; on parle de glycogénolyse anaérobie. Le glucose-6-phosphate est dégradé en acide pyruvique puis en acide lactique, considéré comme un déchet métabolique [GOGNY M., SOUILEM O., 1995] [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010]. Cette conversion est catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase, enzyme sous la dépendance de cofacteurs dérivés de la thiamine, de l'acide lipoïque, de l'acide pantothénique, de la pyridoxine et de la niacine. Le système anaérobie lactique ne peut développer que la moitié de la puissance maximale générée par le système anaérobie alactique [GRANDJEAN D., 1995].

Le principal facteur limitant cette voie est la production d'acide lactique. Mal toléré, il s'accumule dans le muscle avant de rejoindre le secteur sanguin et participe à l'apparition de crampes, d'une fatigue musculaire, de rhabdomyolyse, de myoglobinurie, à l'apparition d'acidose et d'hyperammoniémie.

L'accumulation d'acide lactique a de nombreux effets adverses parmi lesquels :
- l'inhibition de la glycogénolyse et de la glycolyse,
- l'inhibition de la lipolyse,
- l'induction d'œdèmes musculaires osmotiques,
- la réduction de l'afflux d'acide lactique vers la cellule musculaire.

L'entrainement peut augmenter la puissance de cette voie et la tolérance musculaire à l'acide lactique [GOGNY M., SOUILEM O., 1995].

- la voie aérobie, la phosphorylation oxydative ;

Dès que l'effort est long, c'est-à-dire supérieur à quelques minutes, et d'intensité moyenne (de 50 à 70% de la consommation maximale d'oxygène), l'aérobiose devient le système de couverture du besoin énergétique musculaire. Il peut y avoir oxydation du glucose, des lipides et des protéines.

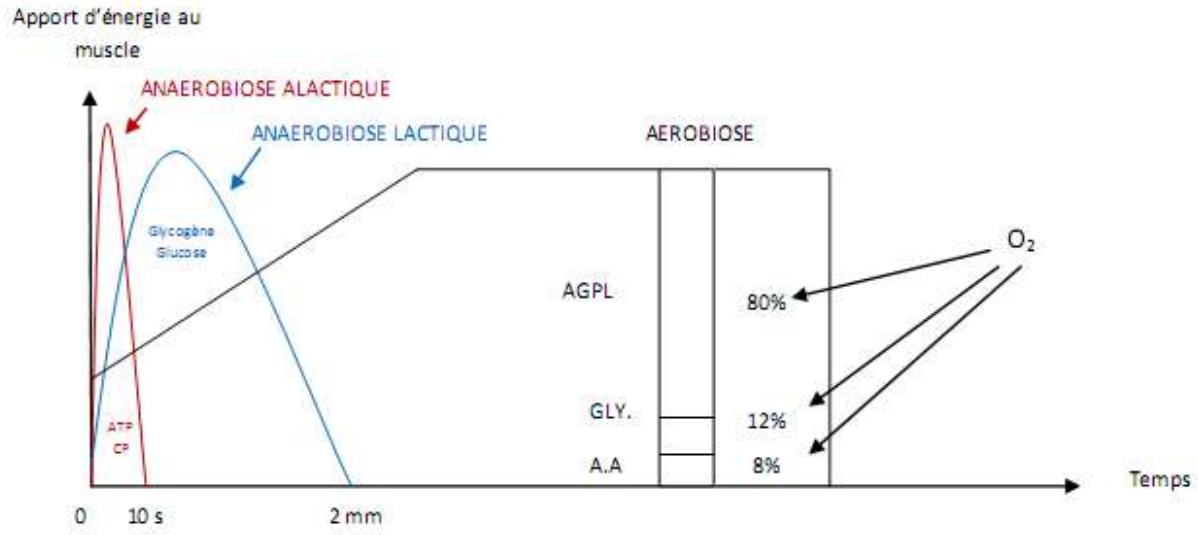
L'oxydation du glucose est la principale source d'énergie musculaire lors d'efforts allant de soixante secondes à quelques minutes. Elle est favorisée par l'ingestion de glucides lents. A puissance équivalente, le taux de renouvellement de l'ATP à partir de l'oxydation du glucose est d'environ 50% de celui obtenu à partir de la glycolyse anaérobie. Le glucose sanguin est, dans un premier temps, oxydé grâce à l'oxygène apporté au muscle par les globules rouges mais très vite, à la différence de l'homme, ce sont les lipides qui vont constituer la source d'énergie préférentielle du chien [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

Les acides gras oxydés dans la cellule musculaire ont pour origine ceux qui sont à longue chaine circulant libres dans le plasma. L'oxydation des acides gras libres dans le plasma constitue la principale source d'énergie pour le muscle lors d'efforts de longue durée mais d'intensité moyenne ou faible (Figure 17). Elle est accrue par le jeûne, la sous-nutrition, et l'entrainement, particulièrement lorsque celui-ci est conduit avec une alimentation à forte teneur en matières grasses [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Cette voie a une capacité théorique infinie mais sa puissance est limitée. Le facteur limitant de cette voie est la consommation maximale en oxygène : VO_2 max [GOGNY M., SOUILEM O., 1995].

Le système aérobie permet d'épargner les réserves de l'animal en glycogène.

Ainsi, lors de tout effort, trois filières métaboliques distinctes se trouvent étroitement intriquées, l'une d'entre elles devenant prépondérante selon le type d'effort envisagé [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991].



AGPL : acides gras libres plasmatiques

Figure 17 : Les voies de production d'énergie [D'après GRANDJEAN D., MOQUET N., PAWLOWIEZ S., TOURTEBATTE AK., CACCIANI F., BACQUE H., (2002)]

Dans le muscle régulièrement sollicité, il y a augmentation de l'activité de la plupart des enzymes intervenant dans le métabolisme de la cellule musculaire (créatine kinase, ASAT, ALAT, LDH) et remaniement des fibres [GOGNY M., SOUILEM O., (1995)].

3. Comparaison de différents types d'effort

Tout exercice, quel qu'il soit, même le plus bref (quelques secondes), fait intervenir le métabolisme aérobie. Lors d'exercice de durée plus longue, la part du métabolisme aérobie augmente [GROUSSARD C., 2006].

Un sprinteur utilise la créatine phosphate et la glycolyse anaérobie pour produire de l'ATP, tandis qu'un coureur d'endurance utilise la phosphorylation oxydative [MURRAY R.K, GRANNER D.K, MAYES P.A., RODWELL V.W., 2002].

a. Le sprint

Les principales sources d'énergie durant un sprint sont la créatine phosphate puis la glycolyse anaérobie qui utilise le glycogène musculaire comme source de glucose [MURRAY 2002]. Seul un taux de glycogène initial plus élevé témoin d'un entrainement d'endurance permettra de tenir plus longtemps [GUILLET R., GENETY J., 1973].

Le sprint utilise le métabolisme anaérobie, lors de l'exercice, suivi du métabolisme aérobie, lors de la récupération [GROUSSARD C., 2006].

b. *La course d'endurance*

Le métabolisme aérobie constitue la principale source d'ATP. Nous l'avons évoqué plus haut, les sources majeures d'énergie sont le glucose sanguin et les acides gras libres provenant essentiellement de la dégradation des triacylglycérols du tissu adipeux, stimulée par l'adrénaline. Le glycogène hépatique est dégradé pour maintenir stable la glycémie. Il constitue aussi une source énergétique mais il est dégradé de façon beaucoup plus graduelle que lors d'un sprint [MURRAY R.K, GRANNER D.K, MAYES P.A., RODWELL V.W., 2002].

Au début d'un tel effort, ce sont la phosphocréatine et le glycogène qui sont utilisés. La production d'acide lactique est faible et va diminuer rapidement. Le métabolisme est uniquement aérobie. La mobilisation des acides gras est active dans le but d'une captation accrue par le muscle.

Au cours de la première heure de travail, l'utilisation des acides gras s'accroit, permettant une économie de glycogène dont l'utilisation est inversement proportionnelle à celle des acides gras.

Au cours de la seconde heure de travail, le taux plasmatique d'acides gras augmente encore ainsi que leur captation et leur oxydation musculaire.

Pendant la troisième heure, si le travail est suffisamment léger pour être poursuivi très longtemps, l'utilisation des lipides devient prépondérante. Les lipides se substituent donc aux glucides lors d'un travail de très longue durée [GUILLET R., GENETY J., 1973].

4. Adaptation de la fourniture en oxygène au cours de l'effort

a. *Consommation de l'oxygène par l'organisme*

La consommation d'oxygène par l'organisme par unité de temps ou puissance maximale aérobie, notée VO_2, se définie comme suit :

$$\mathbf{VO_2 = DC \times (CaO_2 - CvO_2)}$$

Avec ;
- DC : débit cardiaque
- CaO_2 : concentration artérielle en oxygène, déterminée par la ventilation et les échanges alvéolaires,
- CvO_2 : concentration veineuse en oxygène, déterminée par les facteurs tissulaires locaux (circulation musculaire, intensité de la voie aérobie).

Au cours de l'effort sous maximal, la consommation d'oxygène par l'organisme VO_2 augmente progressivement puis atteint une valeur plateau, plus ou moins élevée selon l'effort demandé mais toujours inférieure à VO_2 max [GOGNY M., SOUILEM O., 1995]. Par opposition, un effort maximal est défini par une atteinte de la VO_2 max. L'espèce canine est celle qui a la plus forte consommation maximale en oxygène (VO_2 max) [GRANDJEAN D., 2005]. Durant un effort bref et intense, le muscle utilise plus d'énergie que le système aérobie ne pourrait en fournir. Il contracte donc durant cette période une dette énergétique dénommée « dette en oxygène ».

b. Adaptation au type d'effort lors d'une course de cross canin

Dans le cas d'une course de cross canin, l'effort est qualifié de long car supérieur à quelques minutes et d'intensité moyenne (50 à 70% de la consommation maximale d'oxygène). On parle d'effort sous maximal. L'aérobiose devient donc le système de couverture du besoin énergétique musculaire. Le travail musculaire est prolongé est sera donc à l'origine d'une augmentation des acides gras libres plasmatiques, plus précoce et plus efficace par temps froid. Outre la fourniture d'énergie à la cellule musculaire, le système aérobie permet donc de profiter pleinement d'une adaptation métabolique préexistante mais surtout d'épargner les réserves de l'animal en glycogène, l'épuisement de ces dernières constituant un facteur limitant prépondérant à la poursuite de l'effort. L'anaérobiose lactique peut jouer un rôle non négligeable que l'on peut estimer à 10 ou 15% de la couverture de la dépense énergétique si l'on compare une course de cross canin à une course de vitesse (7 à 20 kilomètres) de chiens de traineaux dans les petites catégories ou en pulka [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991].

Le chien de cross canin se situe entre les deux extrêmes que sont le Greyhound et le chien de traineau en termes de critères de performance puisque l'effort qu'il réalise se situe entre la course de vitesse et l'effort d'endurance extrême, mais plus près de ce dernier.

5. La récupération

Après l'effort, par diminution progressive de la VO_2, il y a resynthèse du glycogène, reconstitution des stocks d'ATP et de phosphocréatine, drainage des lactates, du CO_2, du potassium et des divers produits de déchets accumulés et paiement de la dette en oxygène contractée pendant les premières secondes d'effort [GOGNY M., SOUILEM O., 1995].

On distingue deux types de récupération, la récupération active et la récupération passive, selon qu'un effort musculaire modéré est ou non demandé après la phase intense. Chez l'homme, la récupération active est toujours préférable car elle maintient un certain degré d'irrigation dans le muscle permettant une meilleure diffusion de l'acide lactique et donc une restauration plus rapide de l'intégrité cellulaire [GOGNY M., SOUILEM O., 1995].

B. Stress oxydant et effort physique

1. Effet pro-oxydant de l'effort physique

a. Généralités

(1) L'effort physique constitue un stress pour l'organisme

Rappelons que *le stress* est défini comme un *processus par lequel les facteurs de l'environnement surchargent les systèmes de régulation d'un individu et perturbent son état d'adaptation* [BRUYERE H., 1991].

Quant à *l'exercice physique*, il peut être défini comme *tout mouvement corporel produit par la contraction du muscle squelettique et entrainant une augmentation des dépenses d'énergie par rapport à la dépense de repos.*

Le travail musculaire présente un double effet, il influence directement le besoin énergétique de l'organisme mais perturbe l'homéostasie. L'effort constituerait, ainsi, un stress physiologique. Il peut être assimilable à un processus inflammatoire sur le plan biologique et constitue un excellent modèle d'étude de l'équilibre fragile entre systèmes anti- et pro-oxydant au sein d'un organisme [GRANDJEAN D., 2005].

(2) Augmentation de la consommation en oxygène au cours de l'effort

L'effort physique intense se caractérise par une augmentation remarquable de la consommation en oxygène et constitue un véritable défi pour les systèmes antioxydants qui doivent faire face à une augmentation de la production tissulaire d'espèces réactives de l'oxygène [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. Cette consommation serait 8 à 10 fois supérieure à la consommation basale en oxygène chez le chien [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009]. Le taux d'oxygène au sein du tissu musculaire squelettique actif peut être multiplié par 100 [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

En conséquence, l'exercice devrait mener à une large augmentation des teneurs en espèces réactives de l'oxygène, tout particulièrement au niveau musculaire.

(3) Conséquences du manque d'exercice physique

Observons ce que provoque un manque d'exercice chez l'homme et chez l'animal.

Chez des souris en cage, l'inactivité est associée à une augmentation de la production endothéliale de l'ion superoxyde et à un dysfonctionnement vasculaire. L'immobilisation musculaire s'accompagne, entre autres, d'une augmentation de la production d'$OH^{\bullet}$.

Chez l'homme, des phénomènes similaires s'observent chez les spationautes ou chez des patients ventilés mécaniquement chez lesquels on observe une atrophie du diaphragme [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

b. Origines du stress oxydant au cours de l'effort

(1) Spécificités du tissu musculaire

Le tissu musculaire en tant que cible du stress oxydant :

Le muscle squelettique représente environ 40% du poids corporel des mammifères. Des protéines spécifiques, telles que la myosine et l'actine déterminent la fonction contractile du muscle. Cette fonction contractile est aussi régulée par d'autres protéines qui participent à l'intégrité structurelle des sarcomères fournissant l'énergie nécessaire à la fonction contractile. Le métabolisme élevé des cellules musculaires produit de façon régulière des espèces réactives de l'oxygène et contribue à la pathogénie de nombreuses affections chroniques telles que les dystrophies musculaires, l'insuffisance cardiaque ou le diabète. L'activité contractile a pour conséquence une augmentation rapide des teneurs intracellulaires en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., 2009].

Les fibres musculaires rapides sont plus sensibles aux oxydants que les fibres lentes. En effet, il semblerait que les premières possèdent une moindre capacité de destruction du radical superoxyde. De même, elles semblent plus rapidement altérées par le phénomène de vieillissement que les fibres musculaires lentes [FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., 2009].

Des travaux récents ont mis en évidence une augmentation des teneurs en carbonyls protéiques et en fer catalytique au sein du muscle au cours de l'exercice. Chez l'homme, un exercice intense et prolongé, notamment chez des individus non entrainés, est à l'origine de dégâts musculaires, pouvant être mis en évidence grâce à l'histologie ou en mesurant la libération de myoglobine ou d'enzymes musculaires telles que la créatine kinase dans la circulation sanguine [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

Prédispositions génétiques et prévention des effets délétères du stress oxydant :

Le muscle squelettique d'un Foxhound (race de chien de chasse courant) non entrainé apparaît initialement adapté à soutenir un métabolisme oxydatif à haute intensité. Ainsi, le muscle gastrocnémien du Foxhound présente une richesse en mitochondries nettement supérieure à ce qui est observé chez les autres espèces. Elle dépasse même la teneur en mitochondries rencontrée dans les muscles squelettiques d'autres espèces ayant subi un entrainement d'endurance. Ainsi, le Foxhound apparaît génétiquement prédisposé à un travail musculaire aérobie de haute intensité, de part une pré adaptation à l'extraction et à l'utilisation de l'oxygène [QUAIN C., 2002].

(2) Origines des espèces réactives de l'oxygène produites au cours de l'effort

(a) Modifications biochimiques et homéostatiques du sang au cours de l'effort

L'exercice induit une multitude de modifications du milieu sanguin pouvant affecter son statut redox. Les principaux événements observés au cours de l'effort sont une élévation de la température du sang, une tendance à l'acidose (lactacidémie), une diminution de la pression partielle en dioxygène du sang. Toutes les perturbations de l'homéostasie sanguine

sont susceptibles de modifier le statut redox du sang [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

Une étude réalisée sur des chiens de traineau a montré une diminution significative du statut antioxydant global du plasma à la fin d'une course d'endurance. En effet, ce type de course entraine une dépense énergétique continue durant plusieurs jours, les systèmes antioxydants de l'organisme apparaissent dépassés par le caractère répétitif et prolongé de l'effort [PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001].

Chez l'homme, l'effort d'endurance ou de sprint épuiserait les capacités antioxydantes des érythrocytes. Les érythrocytes seraient plus vulnérables au stress oxydant au cours d'un effort intense en raison de leur exposition persistante à des apports élevés en oxygène, à leur teneur élevée en acides gras polyinsaturés et à la présence de l'hème [PETIBOIS C., DELERIS G., 2005] [CAZZOLA R., RONDANELLI M., RUSSO-VOLPE S., FERRARI E., CESTARO B., 2004].

(b) Les voies de production d'espèces réactives de l'oxygène au cours de l'effort

Différentes voies peuvent être à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours de l'effort :

- ***La réduction incomplète du dioxygène au cours de la phosphorylation oxydative mitochondriale***

Les espèces réactives de l'oxygène produites au cours de l'effort sont synthétisées, pour la majeure partie, au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale (phosphorylation oxydative). Un à quatre pourcents de l'oxygène n'est pas complètement réduit en eau. L'élévation du métabolisme associée à l'effort physique augmente la consommation mitochondriale en dioxygène dans le tissu musculaire et donc la production d'espèces réactives de l'oxygène au sein de la mitochondrie [PACKER L., CADENAS E., DAVIES K.J.A., 2008]. A l'échelle de la fibre musculaire, cette consommation augmente en raison d'une augmentation du débit sanguin et de la différence artério-veineuse. En conséquence, des espèces réactives de l'oxygène sont formées. Le manque d'électrons au niveau du transfert d'électrons de la chaine respiratoire mitochondriale a pour conséquence une production d'anions superoxydes [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003] [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001] [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

- ***Le phénomène d'ischémie-reperfusion***

L'exercice provoque une redistribution du flux sanguin à l'origine d'un phénomène d'ischémie-reperfusion dans certains tissus. Les exercices intenses entrainent une ischémie sévère au niveau du muscle et, par conséquent, une hypoxie [GROUSSARD C., 2006]. La xanthine déshydrogénase oxyde l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique en utilisant le NAD^+ comme accepteur d'électrons. Durant la phase d'ischémie, la xanthine est formée par métabolisme anaérobie et la xanthine déshydrogénase est convertie en xanthine oxydase. Au cours de la phase de reperfusion, la xanthine oxydase continue de convertir l'hypoxanthine en acide urique mais utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons. Il s'ensuit une production d'anion superoxyde [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003] [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

$$\text{Xanthine} + H_2O + 2\ O_2 \rightarrow \text{acide urique} + O_2^{\bullet -} + 2\ H^+$$

L'activation de la xanthine oxydase est sans doute le facteur principal responsable d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'exercice anaérobie. La production d'hypoxanthine a lieu essentiellement lors des exercices anaérobies intenses lorsqu'il se produit un déséquilibre entre la synthèse et l'utilisation de l'ATP [GROUSSARD C., 2006].

- ***Une production neutrophilique et lymphocytaire***

Ce mode de production semble avoir une importance marquée au cours d'un exercice intense et prolongé [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008] [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009]. Au cours d'un effort intense, les espèces réactives de l'oxygène peuvent être générées par un afflux de neutrophiles et de macrophages au niveau musculaire et par une activation de cytokines secondaires aux dommages musculaires. En effet, au niveau du muscle squelettique, la réponse inflammatoire locale à un effort intense est suivie d'un afflux de leucocytes. Il y a intervention de médiateurs tels les interleukines IL-1β et IL-6 et le TNF-α. Ces cytokines favorisent l'afflux de monocytes, de neutrophiles, de lymphocytes et d'autres cellules au niveau tissulaire suite à l'apparition d'une lésion. Plusieurs études s'accordent sur le fait que la neutrophilie est l'une des modifications les plus couramment observée après l'effort. Cette mobilisation dépendrait de l'intensité de l'effort et serait médiée par des hormones de stress telles que les catécholamines, le cortisol et l'hormone de croissance. La quantité de neutrophiles sanguins circulants augmente donc pendant et après l'effort [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009]. L'effort activerait ces phagocytes, générant ainsi une production importante de radical superoxyde et d'HOCl qui intervient dans la protéolyse [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001]. Il en résulte des dommages au niveau de la cellule musculaire. En considérant le temps nécessaire à la mise en place de l'infiltration neutrophilique, cette voie ne peut sans doute pas être à l'origine des espèces réactives de l'oxygène produites au cours de l'exercice. Cependant, elle pourrait constituer une voie secondaire de production et pourrait contribuer à la survenue de dommages tissulaires observés au cours d'épreuves d'ultraendurance tels que le marathon [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. Les espèces réactives produites par l'activation des leucocytes peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire et oxyder certaines protéines plasmatiques [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

- ***L'auto-oxydation des catécholamines***

Les catécholamines voient leurs concentrations sériques augmenter au cours de l'exercice. Des espèces réactives de l'oxygène pourraient être produites suite à leur auto-oxydation [DEATON 2003]. Cependant, à ce jour, aucune étude ne permet d'affirmer l'existence de ce phénomène *in vivo*, notamment lors de l'exercice. Si toutefois l'auto-oxydation avait lieu, elle serait plus prononcée lors des exercices anaérobies comparés aux exercices aérobies. En effet, lors des exercices de type sprint, la production d'adrénaline est multipliée par 12 [GROUSSARD C., 2006].

- ***L'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine***

Chez l'homme, l'anion superoxyde peut être produit suite à l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

- ***L'acidose***

L'acidose semble être un facteur important quant à la survenue du stress oxydant au cours de l'effort anaérobie. En effet, les exercices anaérobies produisent de l'acide lactique. La dissociation de cet acide s'accompagne d'un abaissement du pH. Or, *in vitro*, l'acidose produit des radicaux libres par trois mécanismes.

Les protons favorisent ;

- la dismutation d'$O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2,
- la conversion d'$O_2^{\bullet -}$ en $HO_2^{\bullet}$,
- la production d'espèces réactives de l'oxygène en accélérant la libération du fer par les protéines.

L'exercice anaérobie entraine une forte accumulation de protons à l'intérieur de la cellule. Si la concentration en protons au sein de l'espace intermembrannaire mitochondrial augmente fortement, cela amplifie la formation de radicaux libres au niveau du coenzyme Q. L'anion superoxyde en milieu protoné se dismute pour former du peroxyde d'hydrogène, qui, en présence de fer se décompose et favorise la formation d'$OH^{\bullet}$. De plus, lors des exercices de type sprint, le flux important d'électrons qui existe au niveau de la chaine respiratoire associé à une diminution de l'activité de la cytochrome oxydase contribue à faire du coenzyme Q l'accepteur d'électrons. Il y a formation d'$O_2^{\bullet -}$. Tant que l'exercice ne dépasse pas 50% des possibilités maximales, le pH varie peu. Au delà de cette intensité, le pH sanguin diminue. Modérée au début, l'acidose peut apparaître très rapidement à l'approche de l'effort maximal [GROUSSARD C., 2006].

- ***Autres mécanismes***

De plus, lorsque le muscle squelettique fait l'objet d'une activité contractile excessive, des prostanoïdes et leurs métabolites réactifs sont libérés. Enfin, la perturbation de l'homéostasie calcique et les dégâts infligés aux protéines musculaires contenant du fer peuvent activer la production d'espèces réactives de l'oxygène [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2003].

La quantité d'espèces réactives de l'oxygène serait proportionnelle au taux d'oxygène consommé durant l'effort [PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001].

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, la phosphorylation oxydative mitochondriale est très probablement la principale source de production des espèces réactives de l'oxygène au cours de l'exercice. La contribution des autres voies de production reste controversée [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005]. Bien que soient rapportées des preuves d'une production d'$O_2^{\bullet -}$ et de peroxyde d'hydrogène par la mitochondrie, la xanthine oxydase et les phagocytes au cours de l'effort, les mécanismes exacts et l'importance de chaque voie ne sont pas réellement connus [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008].

(c) Evidences de l'existence d'un stress oxydant au cours de l'effort physique

L'implication des espèces réactives de l'oxygène dans les dommages tissulaires induits par l'exercice est citée pour la première fois dans la littérature au début des années 1970. Ce n'est qu'avec les travaux de DAVIES, en 1982, qu'une relation causale entre la genèse des radicaux libres et les dommages cellulaires oxydatifs fut établie chez des rongeurs [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. Depuis, de nombreuses études ont confirmé cette corrélation chez le chien, l'homme et le cheval [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005].

Stress oxydant induit par l'exercice et état du système glutathion au niveau musculaire :

En 1992, JI observe une augmentation de la teneur en GSSG dans des cellules musculaires squelettiques de rats au cours d'un exercice prolongé. Cette augmentation semble dépendre de l'intensité de l'exercice [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Chez l'homme, un exercice modéré à intense s'accompagne d'une diminution du taux de GHS et d'une augmentation du taux de GSSG plusieurs jours après l'effort. La cellule musculaire squelettique importerait du GHS à partir du plasma au cours de l'exercice. On note donc une mobilisation du GHS vers les tissus soumis au stress oxydant induit par l'effort. Cependant, en cours d'exercice intense et prolongé, DUTHIE montre, en 1990, que, chez l'homme, la fourniture en GHS hépatique n'est pas suffisante pour faire face aux besoins périphériques en GHS [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Stress oxydant induit par l'exercice et teneurs plasmatique et tissulaire en vitamine E :

Selon TIIDUS, en 1993, chez le rat, dans de nombreux tissus (muscle squelettique, cœur, foie), après un entrainement d'endurance, la concentration en vitamine E diminue [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

La concentration plasmatique en vitamine E diminue au cours de l'exercice et des concentrations plasmatiques élevées en vitamine E sont associées à une amélioration des performances [STEVEN C., 2006].

Au cours d'un exercice d'endurance chez le chien de traineau, une diminution de la concentration sérique en vitamine E apparaît conjointement avec une augmentation de la concentration en produits de la peroxydation lipidique, cette dernière étant corrélée à une augmentation de l'activité de la créatine kinase [BASKIN C.R., HINCHLIFF K.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., HAYEK M.G., CHEW B.P., 2000].

La diminution significative des concentrations plasmatiques en vitamine E apparait après 1 à 3 jours d'endurance [PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001].

En 2009, une étude réalisée par MOTTA et al. confirme ces observations.

Evolution de l'activité enzymatique antioxydante au cours de l'exercice :

L'élévation des teneurs plasmatiques en enzymes musculaires telles que la lactate déshydrogénase et la créatine kinase apparaît en réponse à un exercice intense. Ces enzymes sont souvent utilisées comme indicateurs des dégâts musculaires. L'augmentation des taux de créatine kinase est à corréler avec une augmentation du turnover des protéines musculaires. Chez l'homme, la libération de créatine kinase après un exercice intense serait due à un phénomène de nécrose cellulaire. La relation entre la libération des enzymes musculaires et les biomarqueurs du stress oxydant aurait pour origine une augmentation de la perméabilité membranaire suite à la peroxydation lipidique. Chez l'homme, l'augmentation de la teneur plasmatique en acide dimalonique (MDA) est corrélée à une augmentation de la concentration sérique en créatine kinase après l'effort. La production de peroxydes lipidiques serait proportionnelle à l'augmentation de l'apport en oxygène musculaire et serait plus importante au niveau des fibres musculaires qui consomment le plus d'oxygène.

Chez le chien de traineau, une augmentation de la teneur plasmatique en isoprostanes était corrélée à une augmentation de la concentration plasmatique en créatine kinase et à une diminution de la concentration sérique en vitamine E [BASKIN C.R., HINCHLIFF K.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., HAYEK M.G., CHEW B.P., 2000].

Marqueurs de la peroxydation lipidique et altération de la fluidité membranaire au cours de l'exercice :

En 2009, une étude réalisée par MOTTA et al. montre qu'un effort submaximal est à l'origine d'une production d'espèces réactives de l'oxygène chez des chiens non sportifs. Cette production est objectivée par une diminution significative de la fluidité des membranes érythrocytaires, de l'activité de la paraoxonase-1 7 jours après effort, par une augmentation de la concentration plasmatique en aldéhyde dimalonique et une diminution de la concentration plasmatique en vitamine E 24h après effort [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Chez l'homme, la diminution de la déformabilité érythrocytaire observée notamment en cas de stress physique serait surtout due à des facteurs plasmatiques. La rigidification des érythrocytes induite par l'effort serait en partie expliquée par la présence de lactate dans le sang. L'activation des leucocytes et la survenue d'un stress oxydant joueraient un rôle important dans les effets hémorhéologiques au cours de l'exercice. Il est établi que le stress oxydant induit par l'effort est associé à des déficiences hémorhéologiques. Il entrainerait une augmentation du volume érythrocytaire et des teneurs en fibrinogène plasmatique à l'origine d'une agrégation érythrocytaire. Des augmentations significatives du nombre d'oxydations protéiques et du phénomène de peroxydation lipidique au niveau de la membrane érythrocytaire ont été observées au cours des phases précoces et tardives de l'effort physique [BRUN JF., CONNES P., VARLET-MARIE E., 2007].

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation des teneurs en MDA après un exercice intense répété [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008].

Chez des chiens de traineau, au terme de 3 jours consécutifs de course, la teneur plasmatique en isoprostanes augmente mais pas celle en hydroperoxydes [BASKIN C.R., HINCHLIFF K.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., HAYEK M.G., CHEW B.P., 2000].

Evolution d'autres marqueurs du stress oxydant au cours de l'exercice

L'exercice, qu'il soit prolongé ou non, altère le métabolisme de plusieurs oligoéléments (Mn, Zn, Cu, Fe, Se). Des taux adéquats en oligoéléments sont essentiels pour la défense antioxydante d'une cellule soumise à un stress oxydant [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Un effort intense induit une augmentation significative de la carbonylation protéique au niveau du tissu pulmonaire et du muscle squelettique [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Chez le chien de traineau, un exercice d'endurance entraine une augmentation de la teneur plasmatique en acide urique [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. DUNLAP a observé la même tendance au cours d'une étude réalisée en 2006 [DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., 2006].

Un exercice maximal, pratiqué par des chiens de race Greyhound effectuant une course de sprint sur 480 m, est associé à une augmentation significative de la teneur en éthane expiré [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005].

Conclusion partielle :

En définitive, une multitude d'études réalisées chez l'homme et chez l'animal montrent que l'exercice physique apparaît générateur d'un stress oxydant pour l'organisme. Certaines études ne permettent pas de mettre en évidence ce stress malgré un protocole expérimental visant à provoquer son déclenchement via un effort physique donné. Dans ces cas, les auteurs avancent plusieurs hypothèses ;

- les méthodes de caractérisation du stress oxydant utilisées dans les études ne sont pas assez sensibles,

- l'effort physique imposé par l'étude ne « suffit » pas à déclencher un stress oxydant identifiable au plan biologique.

Il semblerait donc que la genèse d'un stress oxydant au cours de l'effort dépende de plusieurs facteurs, notamment de la nature de l'effort et de la sensibilité individuelle des sujets (athlètes par opposition aux non entrainés).

c. Facteurs de variation

(1) Influence du type d'effort physique

L'importance des dégâts causés par un stress oxydant dépend du type d'effort considéré. Il est important de distinguer différents types d'effort, en fonction de la durée, de l'intensité et de la répétition de l'effort.

(a) L'apparition d'un stress oxydant au cours de l'exercice dépend de l'intensité et de la durée de celui-ci

Un exercice restreint, d'intensité modérée participe à l'activation du cycle redox GSH-GSSG. A contrario, un exercice prolongé et intense provoquerait une modification du statut

redox glutathion dans de nombreux tissus, à l'origine d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995]. En effet, les modèles animaux suggèrent une relation complexe entre l'exercice, le glutathion réduit et le stress oxydant [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

Chez l'homme, des dégâts oxydatifs affectant l'ADN sont mis en évidence après un exercice intense et de longue durée mais pas après un effort aigu ou après un effort modéré de longue durée [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Une augmentation de la production de substances pro-oxydantes dépendrait principalement de l'intensité du travail musculaire [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

La relation apparemment positive entre l'intensité de l'exercice et la production d'espèces réactives de l'oxygène ne semble pas aussi évidente au cours d'un effort sous maximal [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Les résultats de plusieurs études se contredisent. Certains suggèrent qu'un effort sous maximal peut favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (BASKIN (2000), HINCHCLIFF (2000), MOFFARTS (2004), RAMEL (2004)). D'autres suggèrent le contraire (LOVLIN (1987), SUBUDHI (2004)). Ces disparités reflèteraient les différences de sensibilité des méthodes utilisées pour caractériser l'existence d'un stress oxydant, l'influence de type d'effort, son intensité et le statut antioxydant initial de l'organisme [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Ainsi, même si toutes les références scientifiques à ce sujet ne s'accordent pas, la plupart évoquent une relation positive entre l'intensité et la durée de l'exercice et la production d'espèces réactives de l'oxygène, point de départ du stress oxydant induit au cours de l'exercice.

(b) Le stress oxydant induit au cours de l'effort ne se limite pas à l'effort aérobie

Cependant, peu d'études ont cherché à mettre en évidence l'existence d'un stress oxydant à l'issue d'exercices anaérobies. L'explication réside probablement dans le fait qu'il était plus ou moins admis que l'augmentation de la consommation en dioxygène est le facteur essentiel d'apparition d'un stress oxydant lors de l'exercice. Mais, nous l'avons cité plus haut, d'autres facteurs interviennent comme l'auto oxydation des catécholamines, l'activation de la xanthine oxydase et l'acidose. Les publications montrent que les exercices anaérobies notamment les exercices de sprint et les exercices isométriques entrainement un stress oxydant pour l'organisme, notamment chez les sujets spécialistes de disciplines athlétiques.

D'après GROUSSARD 2006, une étude réalisée par ALESSIO et al. en 1988 montrait qu'un exercice bref et intense d'une minute, réalisé chez des rats courant à 45 m/min entrainait davantage de dégâts lipidiques musculaires qu'un exercice modéré de 20 minutes à 20m/min. Les fibres rapides (recrutées lors des exercices brefs et intenses) sont plus sensibles aux dommages oxydatifs, par comparaison avec les fibres lentes. Ces résultats ont été retrouvés chez l'homme. Il existe de plus en plus d'études mettant en évidence une augmentation des dommages oxydatifs, que ce soit sur les lipides, les protéines ou l'ADN en réponse à des exercices anaérobies. Si l'exercice anaérobie semble affecter de façon plus importante les lipides, l'exercice aérobie semble concerner davantage les protéines carbonylées plasmatiques.

(2) Influence des conditions environnementales

(a) L'altitude

Le chien peut être concerné par la pratique du sport en altitude dans le cadre de certaines courses de chiens de traineau ou de la gestion de catastrophes par des équipes cynophiles spécialisées, notamment la recherche de personnes ensevelies au cours d'avalanches.

L'hypoxie d'altitude :

La haute altitude est définie par une altitude dépassant 2 500 mètres. Au delà de 1500 mètres, la capacité à effectuer des efforts physiques est diminuée, et ceci semble-t-il de manière directement proportionnelle à l'altitude.

A partir de 3 000 mètres, les capacités de transport de l'oxygène sont réduites de plus de 15%. En effet, la valeur de la concentration en oxygène dans l'air sec est constante mais la pression partielle en oxygène diminue avec la montée en altitude, par conséquent, la quantité d'oxygène utilisable aussi [GUILLET R., GENETY J., 1973].

Conséquences à l'échelle cellulaire :

La réduction de l'apport en oxygène à la cellule a pour conséquences ;

- un frein au bon déroulement du cycle de Krebs et de la chaine respiratoire mitochondriale,
- un déficit en ATP à l'origine d'une perturbation des échanges transmembranaires,
- une altération de la cellule dans son ensemble et notamment des membranes par impossibilité de régulation des échanges calciques.

Basées sur la réalisation de biopsies musculaires, des études réalisées chez l'homme en haute altitude ont montré ;

- une diminution du potentiel oxydatif du muscle par disparition des structures mitochondriales,
- une destruction progressive de fibres musculaires,
- une altération des activités enzymatiques assurant le fonctionnement du cycle de Krebs, de la chaine respiratoire, de la β oxydation et de la valorisation énergétique des corps cétoniques.

Les membranes se révèlent notoirement plus sensibles aux phénomènes de lipoperoxydation lorsque les conditions environnementales deviennent hypoxiques [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Hypoxie et genèse d'espèces réactives de l'oxygène :

Bien que la diminution de la pression partielle en oxygène semble, à première vue, favorable à une limitation de la production en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, on observe une augmentation des dommages oxydatifs par altération des systèmes antioxydants. On observe notamment une diminution des teneurs et de l'activité de certaines enzymes antioxydantes et de l'efficacité du système glutathion [DOSEK A., OHNO H., ACS Z.,

TAYLOR A.W., RADAK Z., 2007]. Une augmentation du métabolisme aérobie ou un état d'hypoxie stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. En effet, au cours de l'hypoxie, une plus faible quantité d'oxygène est disponible pour être réduite en eau au niveau de la cytochrome oxydase. En conséquence, les agents réducteurs s'accumulent au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. La littérature anglo-saxonne parle de stress réducteur. Il y a genèse d'espèces réactives de l'oxygène par auto-oxydation au niveau des complexes mitochondriaux.

Pour des altitudes supérieures à 6 000 mètres, la genèse d'ATP produit de l'AMP qui ne peut pas être recyclé. Sa dégradation produit de l'hypoxanthine. Grâce au complexe xanthine oxydase/déshydrogénase, du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes peuvent être formés. Ce complexe enzymatique est un générateur potentiel d'espèces réactives de l'oxygène en conditions d'hypoxie/reperfusion [DOSEK A., OHNO H., ACS Z., TAYLOR A.W., RADAK Z., 2007].

De plus, il semblerait que l'augmentation des rayonnements UV à haute altitude favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [DOSEK A., OHNO H., ACS Z., TAYLOR A.W., RADAK Z., 2007].

Le « mal aigu des montagnes » se manifeste, chez le chien, par des altérations comportementales, des troubles digestifs et une moindre résistance au travail [GRANDJEAN D., 2005].

La concentration veineuse en hydroperoxydes lipidiques augmente de façon plus marquée au cours d'un effort intense sous hypoxie par rapport à un effort normoxique [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

Le stress oxydant généré affecte l'ensemble des cellules de l'organisme. Cet aspect peut expliquer les myoglobinuries et diarrhées rencontrées au cours de l'effort en conditions extrêmes [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997]. La haute altitude augmente les besoins nutritionnels en vitamines nécessaires pour limiter les dommages induits par un stress oxydant [DOSEK A., OHNO H., ACS Z., TAYLOR A.W., RADAK Z., 2007].

Ainsi, une phase d'hypoxie aiguë (montée en altitude sans acclimatation) concourt à des perturbations à la fois organiques, endocriniennes et cellulaires, à une altération du fonctionnement énergétique de la cellule rendant notamment sa membrane plus fragile [GRANJDEAN D., 2005].

(b) La température et l'hygrométrie

Une étude réalisée chez le rat avance que l'hyperthermie, d'origine endogène ou exogène, serait à l'origine d'une hypoxie au niveau du foie et du tube digestif essentiellement, pouvant entrainer, secondairement, la genèse de radicaux libres. En effet, le choc thermique stimule la consommation intestinale en oxygène et l'acidose cellulaire, participe à l'épuisement des réserves hépatiques en glycogène et créé de larges zones d'hypoxie tissulaire sur la muqueuse intestinale et le foie. L'ATP est largement consommée alors que la demande énergétique surpasse sa reformation. Il s'ensuit un épuisement du pool de phosphagènes contribuant une stimulation de la glycolyse et une réduction de l'activité des centres de transport d'électrons au niveau mitochondrial. Un stress oxydant s'instaure. Les dommages infligés au cytosquelette cellulaire sont à l'origine d'une perte de l'homéostasie cellulaire (accumulation de calcium et de sodium ionisés notamment) qui exacerbe

secondairement la production d'espèces réactives de l'oxygène [HALL D.M., BAUMGARDNER K.B., OBERLEY T.D., GISOFLI C.V., 1999].

En réponse à un stress ou à une augmentation de température, des protéines de choc thermique sont produites par toutes les cellules. Ces protéines facilitent la réparation des protéines, régulent et préviennent l'apoptose et aident à maintenir le stock d'antioxydants [JOHNSON S.I., MCMICHAEL M., WHITE G., 2006].

Une étude réalisée par MILLS et al. en 1996 montre que, chez le cheval de sport, les modifications affectant les marqueurs du stress oxydant (concentrations en hydroperoxydes lipidiques plasmatiques, teneur en glutathion oxydé) observé au cours de l'effort sont exacerbées lorsque les conditions environnementales sont caractérisées par une température et une hygrométrie élevée [MILLS P.C., SMITH N.C., CASAS I., HARRIS P., HARRIS R.C., MARLIN D.J., 1996].

d. Conséquences du stress oxydant observé au cours de l'effort physique

(1) Conséquences sur le muscle

(a) Généralités

Plusieurs références bibliographiques évoquent la sensibilité du muscle au stress oxydant induit au cours de l'exercice, chez plusieurs espèces et par différents aspects ;

- Chez le cheval, le muscle squelettique serait la première cible des dégâts causés par un stress oxydant puisque, comparativement aux autres organes, il possède de faibles concentrations en antioxydants endogènes [SOFFLER C., 2007].

- Dans le même ordre d'idées, le muscle squelettique et certains autres tissus de rats âgés présentent des concentrations basales en espèces réactives de l'oxygène plus élevées et semblent plus sensibles à un stress oxydant induit par l'exercice [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

- Le stress oxydant serait impliqué dans la fatigue oxydative du muscle squelettique et dans l'atrophie musculaire. Une étude réalisée sur une préparation musculaire de gastrocnémien plantaire de chien a montré que la présence de $O_2^{-\bullet}$ contribuait à l'atténuation de la fonction et à l'augmentation de la fatigue musculaire, de tels effets n'étant pas observés en présence d'un antioxydant spécifique [CHANDAN K. SEN, 1995].

(b) L'évaluation des dégâts musculaires

Plusieurs marqueurs permettent d'évaluer les dommages musculaires sur le plan biologique.

La créatine kinase ou créatine phosphokinase [AKTAS 1994, MURRAY 2002, SILIART 2007]

Définition :

La créatine kinase (CK) est une enzyme présente principalement dans les muscles squelettiques, le myocarde, l'encéphale et l'intestin. Cette enzyme permet la mise en réserve et la libération rapide d'énergie par échange de phosphates avec l'ATP. En cas de souffrance musculaire d'origine traumatique, chirurgicale, nutritionnelle ou sportive, son activité plasmatique est très fortement augmentée. Elle est caractérisée par une clairance rapide et une demi-vie plasmatique courte. Ainsi, pour mettre en évidence une souffrance musculaire, les prélèvements doivent être effectués rapidement.

Structure de la créatine kinase :

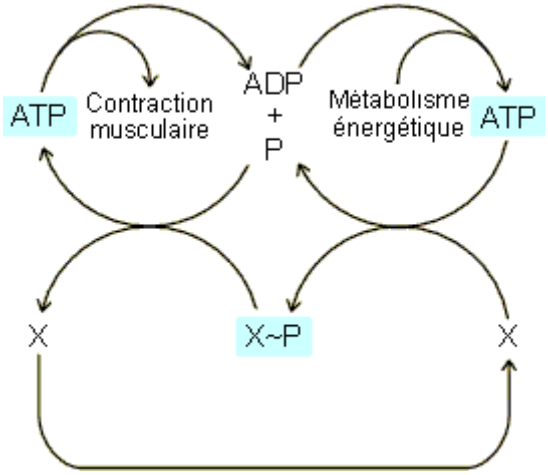
Il s'agit d'une enzyme de poids moléculaire voisin de 85 kDa contenant des résidus de cystéine indispensables à son activité.

Distribution chez le chien :

La créatine kinase a une activité maximale dans le muscle squelettique, le myocarde et l'encéphale ainsi que dans l'intestin. Dans les autres organes, l'activité est très basse.

Activité :

La créatine kinase catalyse la réaction de Lohman, échange réversible d'un résidu phosphate de l'ATP sur la créatine avec formation de créatine phosphate et d'ADP (Figure 18). Cette réaction est en équilibre dans le muscle au repos. En effet, le groupement phosphoryle riche en énergie de l'ATP peut être transféré et mis en réserve sur certaines molécules qui forment le groupe des phosphagènes dont fait partie la créatine phosphate. Ces phosphagènes constituent donc une réserve d'énergie qui peut être mise très rapidement à disposition du système contractile. La créatine phosphate est formée lorsque le muscle est relâché et que les besoins en ATP sont moins importants.



X-P représente un phosphagène tel que la créatine phosphate

Figure 18 : Réaction de Lohman [D'après JAVILLIER M., (1969)]

Métabolisme :

La créatine kinase est inactivée rapidement dans le milieu extracellulaire après sa libération lors de souffrance cellulaire. Elle transite ensuite vers le secteur sanguin par voie lymphatique. La créatine kinase n'est pas éliminée par voie urinaire.

Réalisation pratique et prélèvement :

L'activité de la créatine kinase peut être mesurée sur un prélèvement de sérum ou de plasma hépariné.

Valeurs usuelles chez le chien : < 150 UI/L

Facteurs de variation pour l'interprétation des mesures :

Dans le plasma, la créatine kinase est stable environ une semaine à 4°C et un mois à -20°C. Les valeurs observées chez le jeune (individu de moins d'un an) sont significativement supérieures d'un facteur 2 à 4 par rapport à l'individu adulte. La créatine kinase plasmatique est inférieure chez les chiens de grande taille. La littérature ne rapporte pas d'effet notable du sexe de l'animal.

Utilisations diagnostiques de la créatine kinase :

La créatine kinase plasmatique permet d'apprécier l'intensité et la cinétique de lésions myocardiques ou de lésions musculaires traumatiques. Les troubles musculaires et l'effort musculaire constituent les principales indications de la mesure de celle-ci.

Conditions d'augmentation de la créatine kinase plasmatique :

- hyperthermie maligne,
- myopathies,
- décubitus prolongé,
- réveil suivant une anesthésie gazeuse de longue durée à l'halothane,

- intolérance locale à certaines injections intramusculaires (chlorpromazine, diazépam, chloramphénicol, bipénicilline),
- animaux accidentés,
- interventions chirurgicales longues ou majeures (thoracotomie par exemple),
- dégénérescence musculaire,
- exercice musculaire.

Il est important de bien différencier l'augmentation de créatine kinase due à une atteinte musculaire primaire de l'augmentation due aux conséquences d'une autre affection ou d'un traumatisme. En cas d'affection aiguë, la cinétique de l'activité de la créatine kinase est plus importante que sa valeur absolue.

Créatine kinase plasmatique et effort physique :

Les principales sources d'énergie durant un sprint sont la créatine phosphate puis la glycolyse anaérobie.

La créatine kinase plasmatique diminuerait au fur et à mesure de la progression de l'entrainement. En effet, chez des chiens entrainés, l'activité de la créatine kinase serait significativement plus faible au repos ou après un exercice que chez des chiens non entrainés.

La créatine kinase musculaire est libérée dans le secteur interstitiel à la suite d'une augmentation de perméabilité membranaire liée à des perturbations métaboliques transitoires résultant de l'effort. Cet accroissement de la perméabilité serait responsable de l'augmentation de l'activité observée immédiatement après l'effort. Certaines élévations pourraient résulter d'une mobilisation de la créatine kinase déjà présente dans les voies lymphatiques. Chez les Greyhounds, des augmentations d'activité de la créatine kinase plasmatique n'ont pas été observées après des courses de 235 mètres mais elles étaient fortes après des courses de 400 m et plus. Plus la distance de course est importante, plus le retour aux valeurs usuelles est long.

L'aspartate aminotransférase (ASAT) [HAN LIERDE 1988, SILIART 2007]

Définition :

Les transaminases sont des enzymes intracellulaires. Une élévation de leur activité sérique est observée lors de destructions cellulaires massives, suite à des dégénérescences, des traumatismes, des inflammations dans les tissus musculaires, cardiaques, nerveux ou hépatiques. Puisqu'elles sont en solution dans le cytoplasme, ces enzymes sont libérées facilement lors de lésions de la membrane cellulaire. L'activité sérique est donc un paramètre sensible pour la lésion cellulaire. L'aspartate aminotransférase est abondante dans le muscle où elle prend en charge les radicaux azotés et dans les hépatocytes (elle libère les radicaux azotés utilisés pour la synthèse de l'urée). Suite à sa libération, la persistance de l'ASAT plasmatique est de relativement longue durée (3 à 12 jours). La plupart des organes peuvent, après lésion, libérer de l'ASAT.

Activité de l'ASAT :

L'ASAT catalyse la réaction suivante :

L-aspartate + α cétoglutarate = L-glutamate + oxaloacétate

L'activité de l'ASAT est proportionnelle à la vitesse d'apparition ou de disparition d'un des quatre composants de la réaction ; on peut doser l'un de ces composants. En général, on utilise préférentiellement l'oxaloacétate.

Réalisation pratique et prélèvement :

L'activité de l'aspartate aminotransférase peut être mesurée sur un prélèvement de sérum ou de plasma hépariné.

Valeurs usuelles chez le chien : 10 – 55 UI/L (< 85 UI/L)

Utilisation diagnostique de l'activité de l'ASAT :

L'activité de l'aspartate aminotransférase est augmentée lors de cytolyse hépatique ou musculaire. Ceci est d'autant plus important lors de phénomène lytique aigu. L'augmentation n'est cependant pas proportionnelle à la gravité. En cas de doute sur l'origine hépatique ou musculaire de l'augmentation, on peut doser la créatine kinase.

(2) Les affections organiques du chien de sport en relation avec le stress oxydant et leur prophylaxie

Toute situation physiopathologique de stress va générer une exacerbation de la libération des espèces réactives contribuant de manière importante à l'expression clinique des affections directement liées au stress physique et psychologique. Ainsi, le stress d'effort semble participer à la survenue de certaines affections dont la composante physiopathologique est pour tout ou partie liée aux espèces réactives de l'oxygène ;

- Des affections digestives de type diarrhée et vomissements. Le « syndrome stress diarrhée déshydratation » est bien connu chez le chien de traineau. Un exercice intense et prolongé augmenterait la perméabilité des viscères, autorisant le passage d'endotoxines dans la circulation sanguine [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].
- Des affections musculaires associées à une augmentation des risques de rhabdomyolyse suite à une fragilisation des membranes.
- Le syndrome anémique du sportif, d'origine plurifactorielle et notamment en relation avec la teneur protéique de l'aliment et le stress oxydant induit par l'effort.
- Le syndrome « mort subite » du chien de sport.
- Moins fréquemment, des affections urinaires, respiratoires ou cutanées.

(a) Les manifestations cliniques et comportementales du stress au sens large chez le chien de sport

Ces manifestations peuvent être importantes à prendre en considération dans la mesure où elles peuvent constituer des signes de mal-être ou de douleur chez le chien de sport, éventuellement signes avant-coureurs d'une affection endogène débutante ou installée.

Le tableau suivant (Tableau 2) regroupe plusieurs signes permettant d'identifier trois états chez le chien de sport, allant de l'eustress (ou situation de confort) à la détresse sévère.

Tableau 2 : Traduction clinique des différents états de stress chez le chien

Eustress	Détresse légère	Détresse sévère
- aboiements - en alerte - tonicité - recherche la compagnie - court bien - récupération rapide - hydratation satisfaisante - bon appétit	- grognements - inattention - irritabilité - évite la compagnie - altération de la performance - récupération lente - légère déshydratation - diminution de l'appétit	- animal silencieux - inattention, ne répond pas aux sollicitations - apathie - dépression - ignorance - évitement de l'effort - ne court pas - déshydratation - refus de boire et de manger

[D'après KRONFELD DS., ADKINS TO., DOWNEY RL., Nutrition of the dog and cat. Waltham symposium number 7. Cambridge University Press, 1987 : 133 – 145]

(b) Les affections digestives

Les affections digestives sont la plupart du temps de gravité limitée mais constituent néanmoins le second type d'affections les plus fréquemment observées chez le chien de sport, après les problèmes traumatiques.

Des vomissements, des diarrhées ou de l'anorexie sont des signes cliniques souvent rapportés. Les ulcères gastriques sont souvent la cause des troubles observés mais pas systématiquement. Le stress d'effort induit une accélération globale du transit. Durant un exercice long et intense, la redistribution des apports sanguins entraine une diminution de la circulation sanguine digestive de près de 80%. Il en résulte de moindres apports en oxygène et en nutriments, des dommages de la muqueuse du tube digestif, un moindre renouvellement du mucus protecteur dans la lumière de l'intestin, une diminution de la réabsorption de l'eau dans les parties terminales du gros intestin. Une diarrhée osmotique peut alors apparaitre. L'ensemble de l'intestin est donc fragilisé et devient plus sensible à tout type d'agression. Or, les espèces réactives de l'oxygène produites au cours de l'effort ont une action destructrice sur les cellules digestives. Mais la composante radicalaire n'est pas la seule en jeu dans l'apparition des affections digestives au cours de l'effort. D'autres facteurs seraient en cause, notamment des facteurs hormonaux, la répétition de microtraumatismes sur la muqueuse intestinale ou encore la déshydratation extracellulaire induite par l'effort.

Le syndrome « stress diarrhée déshydratation » est fréquent chez le chien de traineau. Il s'agit d'une diarrhée aiguë dont les conséquences sont rapidement amplifiées et aggravées par la déshydratation associée. La smectite, à raison de vingt grammes matin midi et soir permettrait de traiter cette affection en une douzaine d'heures environ [GRANDJEAN D., 1995].

Lors de l'expédition « Chiens des cimes » ayant pour but d'évaluer les effets de l'altitude sur les perturbations métaboliques déjà induites par un effort physique, la moitié des chiens ont présenté des diarrhées de stress [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

La survenue des affections digestives observées au cours de l'effort serait en partie conditionnée par la nature, la composition, la forme physique et le mode de distribution de l'aliment.

(c) La rhabdomyolyse d'effort

Définition :

La rhabdomyolyse d'effort est encore appelée myoglobinurie paroxystique. Il s'agit d'une affection du chien de sport pouvant être grave car potentiellement associée à un syndrome d'insuffisance rénale aiguë. On observe une ischémie musculaire induisant une lyse des membranes cellulaires, une nécrose et une myoglobinurie.

Etiopathogénie :

Il s'agit d'un syndrome résultant de l'association de plusieurs phénomènes ;

- une accumulation de protons au niveau musculaire durant l'effort,
- un phénomène d'ischémie-reperfusion. En effet, la chaleur accumulée dans le muscle et la production importante d'acide lactique provoquent une diminution du flux sanguin intramusculaire, associée à un déficit potassique intracellulaire et à une nécrose cellulaire progressive [GRANDJEAN D., 1995].
- une destruction des érythrocytes au sein du muscle,
- une myoglobinurie,
- une défaillance rénale potentielle, secondaire à l'hémoglobinurie et à la myoglobinurie.

Présentation clinique de la rhabdomyolyse d'effort :

On distingue différentes formes ;

- la forme suraiguë survient lors d'un effort bref et très intense. Le chien stoppe brusquement son effort et présente d'emblée des difficultés locomotrices importantes. Les muscles, en particulier les fessiers, sont oedématiés et douloureux. Des troubles neurologiques peuvent apparaître. Une insuffisance rénale aiguë avec anurie s'installe rapidement.

-la forme aiguë survient immédiatement après l'effort. A la différence de la forme suraiguë, l'insuffisance rénale s'installe plus lentement. L'évolution morbide est rare mais les séquelles musculaires sont importantes.

- la forme subaiguë ; les signes cliniques apparaissent 24 à 48 heures après l'effort. Les signes urinaires sont plus discrets, l'atteinte rénale est rare.

Facteurs de risque :

La rhabdomyolyse est surtout observée après un effort intense chez des chiens non entrainés [DENIS J., 2005]. Chez le chien de traineau, la rhabdomyolyse d'effort touche préférentiellement les individus au cours des étapes précoces de la course [PIERCY R. J.,

HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001].

La rhabdomyolyse d'effort est surtout observée chez les chiens de chasse et les lévriers de course, notamment le Greyhound qui est une race prédisposée [GRANDJEAN D., 1995].

L'importance du stress oxydant dans la pathogénie de la rhabdomyolyse d'effort ; une association non prouvée :

Comme vu précédemment, pour de nombreux auteurs, les radicaux libres sont produits en abondance au sein du muscle durant l'effort et seraient associés aux dégâts musculaires observés chez l'homme et l'animal. Mais, une étude réalisée par PIERCY et HINCHCLIFF en 2001 laisse penser que les lésions musculaires observées sur des chiens de traineau ne seraient pas initiées par un stress oxydant et que le risque de développer une rhabdomyolyse d'effort ne dépendrait que de la teneur plasmatique en vitamine E avant la course. La pathogénie des lésions musculaires induites au cours de l'effort dépendrait du type d'effort considéré. Il est possible qu'un mécanisme, autre que le stress oxydant, tel qu'un traumatisme répété au cours de l'effort soit à l'origine des dégâts musculaires observés [PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L. & al., 2001].

Traitement de la rhabdomyolyse d'effort :

Le traitement de la rhabdomyolyse d'effort présente plusieurs axes ;
- une fluidothérapie massive et une diurèse forcée,
- un refroidissement des masses musculaires,
- l'utilisation d'un anti-inflammatoire non stéroïdien analgésique,
- du repos,
- une supplémentation nutritionnelle potassique,
- éventuellement des massages doux.

Habituer le chien à la consommation de graisses permettrait de prévenir l'apparition de la rhabdomyolyse d'effort. Mais, paradoxalement, cette pratique est à l'origine d'autres problèmes musculaires car les matières grasses alimentaires ont tendance à « user » les protections antioxydantes de l'organisme [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

e. Prévention

(1) Bonnes pratiques alimentaires

(a) Bases de l'alimentation du chien de sport

Exercice physique et augmentation des besoins énergétiques :

Au même titre que la génétique, l'entrainement ou la psychologie, l'alimentation constitue un des piliers de la performance sportive [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991]. Une alimentation complète et équilibrée est essentielle au conditionnement et à l'entretien du chien de sport. L'alimentation doit être adaptée aux besoins métaboliques pendant l'entrainement et la période de compétition [DENIS J., 2005]. Il est nécessaire de prendre en compte le besoin énergétique spécifique lié au travail musculaire, la déshydratation mais également les besoins nutritionnels engendrés par l'état de stress de l'animal.

Le stress d'effort est responsable d'une élévation des besoins en vitamine E, en vitamines du complexe B ainsi qu'en acide ascorbique [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Une heure de travail conduit à une augmentation d'environ 10% du besoin énergétique d'entretien, ce qui peut amener à accroitre l'ingéré énergétique de 40 à 50% pour une « journée » de travail ou de sport [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

Les variations de température ambiante sont également à prendre en compte, la lutte contre le froid ou le chaud nécessite un surcroit d'énergie pour le chien. Notons que, sur ce point, chez les autres chiens, les variations de la température extérieure semblent avoir un impact plus important sur le besoin énergétique que chez le chien de traineau [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

Objectifs et caractéristiques de l'aliment du chien de sport :

Quantitativement, la ration quotidienne du chien doit être adaptée à l'évolution du poids corporel de l'animal [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

En pratique, un aliment adapté au chien de sport se devra de :
- fournir une énergie de qualité optimale en quantités adéquates,
- minimiser autant que possible le volume et le poids du bol intestinal,
- aider à maintenir un état d'hydratation convenable de l'animal,
- avoir un possible effet tampon sur l'acidification métabolique éventuellement induite par la course.

La charge glucidique et l'adaptation aux graisses sont des stratégies alimentaires qui doivent être adaptées au type d'effort en cause. L'importance de chacune doit prendre en compte l'intensité et la durée de l'effort [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991].

Importance de l'ingéré matières grasses :

Plus la distance de compétition augmente, plus la teneur en matières grasses de la ration doit prendre de l'importance par rapport à l'extractif non azoté résiduel. Les lipides constituent la source énergétique privilégiée du chien de sport en course de sprint type cross canin. Ils associent l'avantage d'une excellente appétence et d'une haute digestibilité et sont très bien tolérés chez le chien. Deux catégories d'acides gras présentent un intérêt :
- les acides gras à chaine courte ou moyenne (que l'on retrouve dans les graisses de coco, coprah, palmiste, …),
- les acides gras essentiels de la série Ω3 (retrouvés dans les huiles de poissons purifiées) ; ils contribuent à conserver l'intégrité de la muqueuse intestinale grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires locales [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991]. Ils sont aussi susceptibles d'améliorer la fluidité des globules rouges et ainsi les échanges d'oxygène [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

(b) Gestion nutritionnelle saisonnière

En respectant le principe d'un plan d'entrainement en trois phases (entrainement, compétition, désentrainement), l'alimentation du chien de sport suivrait ce schéma :

1) Pendant la période de repos, le chien reçoit un aliment d'entretien.

2) Pendant la période d'entrainement, il est intéressant de passer progressivement à une ration de travail ou ajouter progressivement un complément alimentaire de travail à la ration d'entretien.

3) Pendant la période de compétition, le stress ajouté à l'exercice physique peut nécessiter de recourir à des compléments nutritionnels (protéines, L-carnitine, vitamine C).

4) En période de désentrainement, l'objectif est de repasser progressivement à la ration d'entretien.

(c) Gestion nutritionnelle d'une épreuve ou d'un entrainement

L'hydratation est essentielle chez le chien de sport ; il est nécessaire d'y prêter attention, particulièrement au cours d'épreuves se déroulant en période de forte chaleur [DENIS J., 2005].

Chez des chiens non entrainés, la vidange gastrique est retardée par l'exercice de plus d'une heure [DENIS J., 2005]. Par conséquent, en pratique, il faut s'abstenir de nourrir les chiens dans les trois à quatre heures précédant une course. Mais, le chien de sport ne doit pas travailler à jeun. Il est conseillé de distribuer le quart de la ration journalière additionnée d'une grande quantité d'eau, trois à cinq heures avant l'épreuve.

Signalons l'intérêt de la pratique du « snacking » qui consiste à donner au chien un léger surcroit alimentaire aux périodes clés. Il est en effet possible de profiter d'une fenêtre biologique qui se situe environ 30 minutes après la fin d'un effort intense. En donnant un snack (complément nutritionnel de récupération) au chien durant cette période, cela permet de recharger avec efficacité ses réserves musculaires en glycogène [GRANDJEAN D., HAYMANN F., 2010].

(d) Antioxydants et nutrition du chien de sport

Malgré la variabilité des réponses à l'exercice, nous avons vu que l'effort physique peut générer un stress oxydant. Il semblerait donc cohérent d'affirmer que les antioxydants d'origine nutritionnelle puisse prévenir les effets délétères d'un stress oxydant induit par l'exercice physique. Les résultats publiés par différentes équipes ne permettent pas, à l'heure actuelle, de conclure clairement sur ce sujet.

Plusieurs études tendent à montrer les bienfaits des antioxydants d'origine nutritionnelle ;

Nous l'avons cité précédemment, les acides gras essentiels de la série oméga 3 disposent de propriétés anticoagulantes et anti-inflammatoires. Ces propriétés sont particulièrement intéressantes dans une situation d'effort physique en conditions extrêmes. Ils favorisent la déformabilité érythrocytaire au profit d'un transport plus efficace de l'oxygène à travers les capillaires les plus fins, en particulier lorsque l'hématocrite est élevé et en conditions hypoxiques [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Une étude réalisée sur des chiens de traineau suggère qu'une supplémentation à base de myrtilles permettrait de maintenir les teneurs en antioxydants de l'organisme et préviendrait les dégâts oxydatifs induits par l'exercice [DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., 2006].

Une étude réalisée sur des chiens non sportifs suggère qu'une supplémentation en vitamine E, à hauteur de 500 mg de vitamine E durant 10 semaines, aurait un effet protecteur contre les dégâts oxydatifs induits par un effort sous maximal [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

La vitamine E reste sans doute la vitamine la plus utilisée sous forme de supplément nutritionnel chez le chien de sport. Sa réputation est fondée sur ses effets antioxydants tissulaires au niveau du muscle squelettique et du myocarde, sur l'obtention d'une amélioration clinique de l'aptitude à la performance, ainsi que sur une moindre fatigabilité musculaire induite. La vitamine E est également largement vantée pour son efficacité dans la prévention et le traitement des rhabdomyolyses aiguës, principalement en association avec le sélénium. Lors d'efforts brefs et intenses, une administration quotidienne de 100 mg pour un chien de 30 kg est préconisée, avec un passage à 400 mg le matin de la course [GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., 1991].

Etant donné que l'exercice participe à une diminution du pool de groupements thiols de l'organisme, il est concevable de penser qu'une supplémentation en glutathion au cours de l'effort pourrait minimiser les effets néfastes d'un stress oxydant. Des études réalisées chez la souris et chez l'homme soutiennent ces affirmations [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Le tableau suivant (Tableau 3) récapitule l'activité de quelques substances anti-oxydante d'origine nutritionnelle et les doses recommandées de leurs apports.

Tableau 3 : Efficacité de quelques aides nutritionnelles ergogènes à activité antioxydante, disponibles sur le marché chez le chien

	Activité					
Molécule	Effort court	Effort intermédiaire	Effort long	Récupération	Dose quotidienne	Innocuité
Acide ascorbique	++	++	++++	+	100 mg/kg	oui
Superoxyde dismutase enrobée	++	++	+++	++	30 mg/kg	oui
Bioflavonoïdes	+	+	+	+	Non rapportée	oui
L-carnitine	+	++	++++	++	50 mg/kg	oui

[D'après GRANDJEAN D. & HAYMANN F., 2010]

D'autres publications exposent certaines limites à ces bienfaits apparents des antioxydants d'origine nutritionnelle ;

Tout d'abord, une alimentation inadaptée affecterait le statut antioxydant et augmenterait la sensibilité d'un organisme au stress oxydant induit par l'exercice [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Chez le chien de traineau, une supplémentation à base d'α-tocophérol, d'acide ascorbique et de β-carotène n'atténue pas l'augmentation de l'activité de la créatine kinase

observée après un exercice d'endurance. Cette supplémentation n'aurait donc pas de fonction protectrice sur le muscle [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

A ce jour, la nature équivoque des résultats des études menées reflète la diversité des facteurs intervenant dans la gestion du stress oxydant induit au cours de l'exercice (nature de l'antioxydant testé, nature de l'effort considéré, méthode d'exploration du stress oxydant). Il est important de retenir que l'impact des antioxydants dépend de la durée, de l'intensité et du type d'exercice et du profil des individus testés. Par exemple, l'âge augmente la sensibilité des cellules aux attaques oxydatives et diminue les capacités endogènes antioxydantes [SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., 2001].

(2) Limiter le stress « psychologique »

Un stress prolongé affecte le fonctionnement des systèmes nerveux, endocrine et immunitaire. Chez le rat, un stress provoqué par une immobilisation est associé à une augmentation des dégâts oxydatifs induits sur les lipides, les protéines et l'ADN au niveau cérébral. Cette augmentation serait probablement corrélée à une augmentation de la production de $NO^{\bullet}$ et à un dysfonctionnement mitochondrial. De même, la privation de sommeil chez l'animal augmenterait les dégâts oxydatifs survenant au niveau cérébral [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

L'étude réalisée en 1997 dans le cadre de l'expédition « Chiens des cimes » sur des chiens de recherche en altitude aurait permis de mettre en évidence une souffrance et une dégradation cellulaire supérieures à celles observées chez l'homme. Il semblerait que l'animal objective notablement moins la douleur ou la sensation de malaise ressenti au plan clinique et comportemental. Dans ce sens, la pression psychologique d'une situation exacerberait le moindre problème physique [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Néanmoins, il reste encore beaucoup de travail pour clarifier la contribution exacte du stress « psychologique » dans la genèse d'espèces réactives de l'oxygène.

2. Effet antioxydant de l'effort physique

a. Généralités sur l'entrainement

(1) La notion d'entrainement et de surentrainement

L'entrainement est défini comme *la préparation physique, technico-tactique, intellectuelle et morale de l'athlète à l'aide d'exercices physiques* [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Le surentrainement correspond à un non respect de la période de récupération après un entrainement donné. En effet, un exercice physique est suivi d'une fatigue, plus ou moins marquée et sorte de mécanisme protecteur permettant d'éviter l'épuisement total des réserves énergétiques de l'organisme. Bien que les limites de la fatigue puissent être repoussées par les effets adaptatifs de l'entrainement, la récupération après effort est importante. Ainsi, la charge d'entrainement et la restauration qui lui succède sont étroitement liées et se conditionnent réciproquement [GRANDJEAN D., MOQUET N., PAWLOWIEZ S., TOURTEBATTE AK., CACCIANI F., BACQUE H., 2002].

Il participe à une augmentation des possibilités maximales de transport de l'oxygène et donc de VO_2 max.

Un plan d'entrainement est défini par la fréquence (nombre d'exercices par périodes), l'intensité (vitesse du trot ou du galop, poids utilisé) et la durée des exercices (nombre de répétitions ou durée totale) [DENIS J., 2005]. Le plan d'entrainement doit être divisé en trois périodes : la préparation ou entrainement au sens strict, la compétition où l'objectif est le maintien de l'état de forme et la transition correspondant au désentrainement. Une structuration selon ce principe permet d'éviter le surentrainement [GRANDJEAN D., 1995].

(2) La gestion de l'entrainement ; quelques principes

Entrainer correctement son chien à une pratique sportive passe par le respect de plusieurs principes ;

- Respect de la motivation du chien ; l'entrainement ne doit en aucun cas être trop éprouvant, l'objectif est de conserver les qualités de motivation et la « volonté » de performance du chien. Ceci passe par un équilibre entre le jeu et la performance,
- Principe de la charge d'entrainement croissante correspondant à une augmentation progressive du volume et de l'intensité des exercices,
- Principe de la charge d'entrainement continue, correspondant à l'enchainement régulier de sessions d'entrainements conduisant à une amélioration de la performance jusqu'à atteindre une limite déterminée par les facteurs génétiques,
- Principe de la périodicité de la charge d'entrainement ; il s'agit de respecter les trois périodes du plan d'entrainement adaptées à chaque période de l'année (entrainement, maintien de l'état de forme en période de compétition puis désentrainement),
- Principe de la variation des charges d'entrainement, l'objectif étant de jouer à la fois sur la vitesse, la puissance, la force, l'endurance et la coordination pour une discipline qui fait appel à plusieurs de ces qualités. Dans ce cadre, les sports de traine sur terre, de part la grande variabilité des courses organisées, sont de bons exemples de disciplines sportives requérant puissance, vitesse, endurance et coordination.

L'entrainement est évidemment à adapter à l'individu. Néanmoins, l'entrainement général de tout individu doit comporter un entrainement du système de transport de l'oxygène, un entrainement musculaire et un entrainement destiné à entretenir la mobilité articulaire.

(3) Application aux courses de cross canin

Dans le cadre des courses de vélocross et d'attelage canin, l'objectif de l'entrainement est de développer la puissance aérobie. Mais l'entrainement de la puissance anaérobie ne doit pas être négligé pour autant dans la mesure où, sur ce type de course, les chiens sont amenés à courir sur des courtes distances et sur des parcours comportant parfois du dénivelé.

L'entrainement de la puissance anaérobie est plutôt basé sur des exercices intenses mais de courte durée et entrecoupés de périodes de repos brèves.

L'entrainement de la puissance aérobie est quant à lui basé davantage sur des courses continues, sur de plus longues distances.

Chez l'homme, la réponse à l'entrainement aérobie augmente après la puberté. De façon similaire, chez le chien, la maturité sexuelle a un impact sur la réponse à l'entrainement [DENIS J., 2005].

L'entrainement à l'endurance doit cibler plusieurs groupes musculaires, sur une longue période (supérieure à 15 minutes). Les exercices d'entrainement sont effectués plusieurs fois par semaine. Des modifications durables apparaissent au niveau du muscle soumis à un entrainement aérobie ; notamment [DENIS J., 2005] ;

- une augmentation de la vascularisation et, par voie de conséquence, une augmentation de l'apport en oxygène,
- une augmentation de la quantité d'enzymes impliqués dans les voies oxydatives et, par conséquent, une amélioration de la régénération de l'ATP.

L'endurance est inévitablement affectée par une restriction de l'activité. Des chiens maintenus au repos durant 8 semaines voient leur endurance diminuer de 41%. Ces modifications apparaissent réversibles au bout de 8 semaines de réentrainement [DENIS J., 2005].

En sports de traine sur terre, les efforts peuvent être très variables d'une activité à l'autre et d'une compétition à l'autre. En effet, l'effort dépend tout d'abord du profil de la course (dénivelé, distance, type de sol) mais aussi de la charge à trainer, du nombre de chiens attelés et de la performance du coureur humain. Tous ces facteurs sont à prendre en compte dans l'établissement du programme d'entrainement.

Ainsi, le programme d'entrainement doit amener l'organisme en conditions de stress suffisantes mais non excessives pour permettre une adaptation de celui-ci à l'effort considéré. Mais, une fréquence, une durée ou une intensité excessives des exercices peuvent avoir un impact négatif sur l'entrainement, altérer la condition physique préexistante, provoquer des lésions par un manque de repos, une fatigue musculaire ou cardio-vasculaire excessive. Un repos adéquat est essentiel durant la période de conditionnement pour prévenir la fatigue musculaire et la survenue de blessures par surentrainement. Cependant, le conditionnement a pour conséquence de minimiser les besoins de repos et la quantité d'acide lactique circulant après une activité musculaire intense chez le chien [DENIS J., 2005].

b. Le stress oxydant observé au cours de l'effort physique peut être prévenu par l'entrainement

(1) Une adaptation de l'activité enzymatique

En 2000, on rapporte déjà que, chez l'homme, l'augmentation significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène observée après un effort s'accompagne rapidement d'une augmentation significative de l'expression des enzymes antioxydantes et des protéines de choc thermique [McARDLE A., JACKSON M.J., 2000]. Des études ultérieures confirmeront cette observation.

Il semble de plus en plus évident qu'un entrainement régulier augmente l'activité de certaines enzymes antioxydantes et prévient les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène induites par l'exercice [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

De même, chez l'homme et chez l'animal, certaines études montrent une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes au repos, après une période d'entrainement en sprint de six ou sept semaines. Les sujets plus entrainés semblent présenter des activités enzymatiques antioxydantes musculaires (catalase et superoxyde dismutase) plus importantes que chez des sujets moins entrainés [GROUSSARD C., 2006].

Les animaux et l'homme développent des réponses adaptées aux efforts réguliers ou d'endurance modérés. Leur capacité d'endurance augmente considérablement via une biosynthèse mitochondriale et une augmentation du nombre de mitochondries au niveau musculaire. Les mécanismes adaptatifs semblent minimiser le stress oxydant et s'accompagnent d'une majoration de l'importance de la défense antioxydante, d'une diminution de la production basale d'oxydants. Chez la souris, l'effort modéré diminue significativement le développement du stress oxydant lié à l'âge, augmente l'espérance de vie, prévient le déclin de la fonction mitochondriale et favorise la performance comportementale [PACKER L., CADENAS E., DAVIES K.J.A., 2008].

L'entrainement régulier stimulerait l'activité d'enzymes musculaires anti-oxydantes telles que la Mn-superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase. Les effets de l'entrainement sur l'activité de la CuZn-SOD et sur la catalase semblent moins évidents. L'entrainement à l'exercice d'endurance peut augmenter l'activité enzymatique antioxydante au sein des érythrocytes et diminuer la production neutrophilique d'anion superoxyde [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

Il est important de noter que l'effet de l'entrainement sur l'activité d'enzymes antioxydantes varie d'une enzyme à l'autre. Le muscle squelettique est un des organes qui possèdent les taux les plus bas en enzymes anti oxydantes. Pourtant, dans ce tissu, le flux en oxygène augmente largement au cours d'un effort intense. En conséquence, la genèse d'espèces réactives de l'oxygène à ce niveau déclenche la synthèse d'enzymes anti-oxydantes de façon directe ou indirecte [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

(2) Une adaptation des systèmes de réponse au stress

La régulation de l'expression de certains gènes, de même que la régulation de protéines de stress pourraient être à l'origine de la réponse adaptive de l'organisme au stress oxydant induit au cours de l'exercice [SACHDEV S., DAVIES K. J.A., 2008]. En effet, les protéines de choc thermique sont susceptibles de stimuler la synthèse protéique et de participer à la préservation de l'intégrité cellulaire. Une augmentation de la transcription de protéines de choc thermique est rapidement suivie d'une augmentation du pool d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase ou la catalase. La production d'espèces réactives de l'oxygène apparaît comme un signal d'adaptation pour les cellules musculaires [McARDLE A., JACKSON M.J., 2000].

(3) Autres marqueurs de l'effet bénéfique de l'entrainement

REYNOLDS et DUNLAP (2005) ont étudiés les effets de l'entrainement et de l'environnement sur un groupe de chiens de traineau en analysant les effets de l'exercice sur le taux de NO et le statut antioxydant global des chiens. Les chiens non entrainés auraient présenté une augmentation du taux de NO et un abaissement significatif de leur statut antioxydant au cours de l'étude [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

Chez le Beagle, un entrainement régulier à un effort intense s'accompagne d'une augmentation de la teneur en glutathion réduit (GHS) au sein des muscles locomoteurs et

d'une augmentation de l'activité de la γ-glutamyl transférase (GGT), enzyme intervenant dans la fourniture des tissus en GHS. Ainsi, les muscles semblent capables de s'adapter à un stress oxydant chronique [Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, 1995].

Des études réalisées chez des rats ont permis de mettre en évidence une augmentation des teneurs plasmatiques en carbonyls protéiques après un effort aigu chez des rats non entrainés. Cette augmentation n'était pas objectivable sur les individus entrainés [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Chez l'homme, PETIBOIS suggère que l'entrainement à l'endurance, qu'il soit modéré ou intense, diminue la sensibilité des érythrocytes au stress oxydant généré par l'effort par le biais d'adaptations cellulaires spécifiques, notamment au niveau de la membrane érythrocytaire. Dans la même idée, la production d'érythropoïétine est plus importante chez les sujets entrainés. Or, l'érythropoïétine possède un rôle protecteur pour la membrane érythrocytaire contre les dommages oxydatifs [PETIBOIS C., DELERIS G., 2005].

L'entrainement, qu'il soit de type aérobie ou anaérobie, semble avoir un effet protecteur contre le stress oxydant induit au cours de l'exercice physique [GROUSSARD C., 2006].

3. Un équilibre fragile entre bénéfice de l'exercice et conséquences délétères du stress oxydant

L'exercice physique est bénéfique jusqu'à un certain point. Un exercice prolongé et intense surcharge les capacités antioxydantes de l'organisme, augmente la consommation en substances antioxydantes et favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène. Un exercice d'endurance répété est associé, chez le chien, à une augmentation de la peroxydation lipidique et à une diminution des concentrations plasmatiques en antioxydants [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].

Conclusion partielle :

Ainsi, le stress oxydant est une situation dangereuse pour l'organisme. Elle peut être causée et favorisée par l'exercice physique mais elle peut être contenue et stabilisée par un entrainement bien mené [PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., 2010].Par conséquent, chez l'homme, la pratique d'un exercice physique régulier est cruciale pour le maintien des capacités de défense de l'organisme contre les dégâts provoqués par les espèces réactives de l'oxygène [CHANDAN K. SEN, 1995]. Nous nuancerons cet aspect chez le chien même si plusieurs publications semblent permettre d'avancer les mêmes conclusions.

4. Caractérisation du stress oxydant au cours de l'effort

Beaucoup d'écrits se sont attachés à mettre en évidence les dégâts causés par le stress oxydant induit par l'exercice mais beaucoup d'entre eux ont utilisé des biomarqueurs non fiables tels que les TBARS. Le recours aux TBARS est critiqué en raison de son manque de spécificité et la tendance des TBARS à réagir avec d'autres aldéhydes, des carbohydrates et des prostaglandines. De plus, l'élimination rapide des TBARS du plasma a tendance à fausser la mesure des quantités en aldéhyde dimalonique [GROUSSARD C., 2006]. Il existe aujourd'hui, des marqueurs tout à fait fiables utilisables chez l'homme et chez le chien tels que l'excrétion urinaire de la 8-hydroxydéoxyguanosine réflétant les dégâts infligés à l'ADN

ou l'activation de processus de réparation de l'ADN [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007]. La mesure de la teneur en éthane expiré constitue une technique non invasive et en temps réel de caractérisation d'un stress oxydant induit par l'effort [WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G. & al., 2005].

Le pentane exhalé peut augmenter de 60 à 90 % à l'effort et selon l'intensité de celui-ci et se révèle plus spécifique de l'atteinte des acides gras membranaires mais la technique de mesure est difficilement réalisable en pratique chez le chien [GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., 1997].

Les sous produits de la peroxydation des lipides sont les marqueurs des dommages tissulaires induits par l'exercice les plus fréquemment utilisés. En effet, des efforts sous maximaux ou des efforts brefs mais intenses sont à l'origine d'une majoration du phénomène de peroxydation lipidique chez de nombreuses espèces [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

A contrario, certains écrits n'ont pas mis en évidence d'augmentation des dégâts oxydatifs après un exercice. Pour expliquer cela, rappelons que l'étendue des dégâts dépend de l'intensité de l'exercice. Par ailleurs, les dégâts oxydatifs qui surviennent localement peuvent ne pas avoir de traduction systémique [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

De plus, notons que les muscles produisent des espèces réactives de l'oxygène à des fins utiles pour l'organisme. En effet, les contractions du muscle squelettique participeraient à l'augmentation des teneurs extracellulaires en $O_2^{\bullet-}$ qui contribuerait à la régulation du métabolisme calcique. En effet, $O_2^{\bullet-}$ est mis en évidence au sein du muscle au repos [HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 2007].

A la suite d'un effort, les modifications affectant les concentrations plasmatiques en antioxydants reflètent le taux de leur relargage à partir des stocks tissulaires et leur taux d'utilisation. Durant un effort, le statut antioxydant d'un organisme est influencé par le type d'effort, le moment de prélèvement des échantillons, le niveau d'entrainement et les facteurs environnementaux tels que la température ambiante et l'altitude. Un effet apparemment incohérent de l'exercice sur le statut antioxydant d'un individu doit amener à prendre en compte ces différents aspects pour l'interprétation des résultats [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003].

Conclusion :

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites en quantités excessives lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée ; on parle alors de stress oxydant. De manière directe ou indirecte, ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire, à l'origine d'une perturbation des mécanismes cellulaires. La formation d'espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme est constante et indissociable du vivant dans une atmosphère oxydante. Mais, les excès dépendent de facteurs exogènes dont l'exercice physique intensif.

Des variations considérables sont observées concernant le degré et la sévérité d'un stress oxydant systémique induit par l'exercice, indépendamment des espèces. Beaucoup de publications concernent l'homme et les rongeurs. La possibilité de moduler le statut antioxydant d'un organisme à travers la nutrition et la possibilité d'améliorer les performances motivent les recherches actuelles. Il n'est pas significativement prouvé que l'exercice induit un stress oxydant voire des dégâts oxydatifs dans tous les cas de figure. Il semble clair que des facteurs tels que la durée, l'intensité de l'effort, la race, le potentiel sportif, l'état de santé et les conditions environnementales ont un impact sur la survenue, l'importance et les conséquences d'un stress oxydant [DEATON C.M., MARLIN D.J., 2003]. Chez l'homme, en considérant que les effets bénéfiques d'un exercice régulier sur la fonction musculaire et sur la santé sont associés à des épisodes répétés de stress oxydant, l'effort physique est un exemple caractéristique démontrant que les espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydant ne sont pas nécessairement des entités délétères [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

Concernant l'apparition d'un stress oxydant au cours de l'exercice, le regard a tendance à se porter en priorité sur le muscle comme source d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui masque les autres sources potentielles d'espèces réactives de l'oxygène. Nous avons vu que le plasma et les cellules sanguines peuvent générer de façon autonome des quantités importantes d'espèces réactives de l'oxygène au cours de l'exercice [NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., 2009].

Seconde partie : étude expérimentale Application au chien de cross canin réalisant un effort de courte durée sur terre

Introduction : intérêt et objectifs de l'étude

Le stress oxydant est étudié depuis plusieurs dizaines d'années chez l'homme, notamment pour son rôle dans le développement de multiples affections. L'impact croissant du sport dans la société actuelle et le souci de majorer toujours plus les performances a motivé les recherches quant à l'impact du stress oxydant au cours de l'effort. Chez le chien, de nombreuses études se sont intéressées à cet aspect chez le chien de traineau réalisant des courses d'endurance. A notre connaissance, rares sont les écrits s'étant intéressés à l'existence d'un phénomène similaire chez le chien réalisant un effort de plus courte durée. Le développement actuel de la discipline cross canin a motivé la tentative de mise en évidence de ce phénomène chez le chien réalisant un effort de courte durée, sur terre.

L'objectif de cette étude est de tenter d'observer d'éventuels marqueurs de l'existence d'un stress oxydant chez le chien réalisant un effort de courte durée sur terre.

I. Sujets, matériels et méthodes

A. La population d'étude

1. Sélection de la population

La population analysée dans cette étude regroupe des chiens du 6e Trophée Sud Bourgogne, course de cross canin qui s'est déroulée du dimanche 24 octobre 2010 au dimanche 31 octobre 2010. Cette course regroupait trois disciplines : le cross canin, le vélocross et l'attelage à deux ou quatre chiens.

Le trophée se composait de dix étapes réparties sur une semaine, dans la région de Charolles, sur huit sites différents, sur parcours balisé :

J0 : Dimanche 24 octobre 2010

Etape A : Charolles ; 6500 m de course, départ à 15h

J1 : Lundi 25 octobre 2010

Etape B : Mont ; 6500 m, départ à 10h

J2 : Mardi 26 octobre 2010

Etape C : Saint Vincent Bragny ; 7500 m, départ à 15h

J3 : Mercredi 27 octobre 2010

Etape D : La Tagnière; 5000 m, départ à 9h en ligne

Etape E : Uchon ; 5600 m, départ à 15h

J4 : Jeudi 28 octobre 2010

Etape F : Oudry ; 3500 m, départ à 15h

J5 : Vendredi 29 octobre 2010

Etape G : Guegnon ; 7000 m, départ à 10h

J6 : Samedi 30 octobre 2010

Etape H : Chassy ; 4000 m, départ à 10h

Etape I : Marly/Arroux ; 3000 m départ à 15h

J7 : Dimanche 31 octobre 2010

Etape J : Montceau-les-mines ; 5500 m, départ à 10h

Les concurrents de l'édition 2010 du Trophée Sud Bourgogne étaient libres de s'inscrire en totalité ou partiellement au trophée, de faire l'impasse sur une ou plusieurs épreuves.

Pour des raisons de disponibilités du manipulateur et du prix de revient des analyses, seules les étapes A et J ont été suivies.

La participation à l'étude s'est effectuée sur volontariat. Les inscrits au trophée ont été avertis de l'étude plusieurs semaines avant la course par le biais d'un encart sur le site web de la course :

« Dans le cadre d'une étude du stress oxydant chez des chiens de sprint en compétition hors neige, le vétérinaire Jean-Jacques Thiébault de l'Ecole Vétérinaire de Lyon s'est rapproché du CTPB afin de profiter du TSB. Cette compétition de 10 étapes sur 8 jours semble idéale pour mettre en évidence les impacts de ces courses de courtes distances mais intenses et répétées sur la physiologie du chien. Ces éléments sont le sujet de la thèse d'une de ses étudiantes qui l'accompagnera. Ils ont donc besoin de volontaires pour participer à ces recherches scientifiques. Les chiens ne seront pas trop dérangés ; une prise de sang avant la première étape, Charolles, et juste après la course, et, de même avant et après la dernière étape, Montceau-les-mines. Les propriétaires recevront les résultats complets des analyses : c'est donc l'occasion d'avoir un bilan sanguin gratuit de votre chien (avant et après une semaine d'effort) qui permettra de vérifier le bon fonctionnement des muscles, du foie, du pancréas, des reins. »

Suite à cette démarche, 26 coureurs se sont portés volontaires pour leurs chiens. 2 attelages de 5 chiens et 10 chiens prévus pour courir en vélocross ont été sélectionnés pour l'étude. Sur les 10 chiens prévus pour participer à l'ensemble du Trophée en vélocross et prélevés lors de l'étape A, 8 ont pu être à nouveau prélevés lors de l'étape J, les 2 autres ayant abandonné.

2. Recueil des commémoratifs de chaque individu prélevé

Les commémoratifs concernant chaque individu prélevé ont été relevés par le biais d'un questionnaire distribué au coureur le jour de la course (Annexe 1, p.161). Ont été demandés les points suivants ;

- les coordonnées du propriétaire,
- le numéro d'identification de l'animal,
- la date de naissance,
- le sexe,
- le mode de vie,
- le poids,
- le caractère stérilisé ou non de l'animal,
- la ration alimentaire, la quantité, le mode et la fréquence d'administration,
- la ration alimentaire reçue le jour J,

- le programme d'entrainement suivi par l'animal,
- les antécédents médicaux et/ou chirurgicaux.

3. L'échantillonnage

Les moyens à disposition nous ont permis de prélever une vingtaine de chiens lors de la première et lors de la dernière épreuve du trophée. Les chiens prélevés ont été ceux dont les coureurs s'étaient portés volontaires. Au départ du trophée, environ 25 coureurs s'étaient portés volontaires pour la participation à l'étude. Ont été retenus, en priorité, les coureurs participant à l'ensemble des épreuves du trophée et, dans la mesure du possible, les chiens de races Greyster et Nordiques.

4. Caractéristiques de la population étudiée

Nous avons choisi de nous intéresser à deux groupes de chiens effectuant la totalité du trophée.
- Premier groupe : 8 chiens en vélocross
- Second groupe : 9 chiens en attelage de 2 ou 4 chiens

Le Tableau 4 expose, ci-dessous, les caractéristiques de la population d'étude. Notons qu'il s'agissait de chiens jeunes adultes (âge moyen inférieur à 6 ans), avec une proportion plus importante de femelles.

Tableau 4 : Caractéristiques de la population d'étude

Dominante / Sexe, âge et poids	Nombre de mâles	Nombre de femelles	Âge moyen (années)	Poids moyen (kg)
Vélocross	**4**	**5**	**5,5**	**24,9**
Attelage	**2**	**7**	**2,6**	**20,4**
Total	6	12	4	22,9

Tableau 5 : Effectifs des types raciaux de la population d'étude

Dominante / Race	Husky Sibérien	Greyster	Beauceron	Chien d'ours de Carelie	Braque
Vélocross	**4**	**2**	**1**	**1**	**1**
Attelage	**9**	**0**	**0**	**0**	**0**
Total	13	2	1	1	1

Malgré le faible effectif des chiens étudiés, le Tableau 5 illustre le fait que notre étude s'est intéressée à des attelages composés exclusivement de chiens de race Husky Sibérien tandis que le morphotype des chiens participant au vélocross était varié (équivalence races Nordiques/races de « vitesse »).

5. Caractéristiques de l'effort étudié

Le Tableau 6 récapitule les vitesses moyennes de course de chaque chien prélevé lors des étapes A et B et la distance totale parcourue sur le trophée. Précisons que les données concernant le dénivelé des courses n'étaient pas accessibles.

Tableau 6 : Vitesses de course et distance totale parcourue au cours du trophée

Discipline dominante sur le trophée	Chien	Vitesse moyenne de course lors de l'étape A (6500 m)	Vitesse moyenne de course lors de l'étape B (5500 m)	Distance totale parcourue sur le trophée (km)
ATTELAGE 4 CN	1	13,0 km/h	14,1 km/h	52,1
	2	13,0 km/h	14,1 km/h	52,1
	3	13,0 km/h	-	29,6
	5	-	14,1 km/h	22,5
	6	13,0 km/h	20,4 km/h	52,1
	16	22,1 km/h	26,7 km/h	52,1
	17	Non mesurée	Non mesurée	-
	18	22,1 km/h	26,7 km/h	47,1
	19	22,1 km/h	26,7 km/h	52,1
	20	22,1 km/h	26,7 km/h	52,1
	Moyenne	**17,55 km/h**	**21,18 km/h**	
VELOCROSS	4	10,3 km/h	14,1 km/h	47,1
	7	26,4 km/h	31,4 km/h	52,1
	8	27,1 km/h	29,6 km/h	52,1
	10	22,6 km/h	25,8 km/h	52,1
	11	25,5 km/h	31,4 km/h	40,6
	12	20,0 km/h	24,8 km/h	52,1
	14	26,0 km/h	28,6 km/h	52,1
	15	20,5 km/h	22,7 km/h	52,1
	21	Non mesurée	Non mesurée	-
	Moyenne	**22,3 km/h**	**26,05 km/h**	

Pour une même étape, notons que la vitesse moyenne de course est plus élevée chez les chiens en catégorie « Vélocross » par rapport à la catégorie « Attelage ». Cela semble, à première vue, s'expliquer par le morphotype du chien en course (davantage de Greysters, races de « vitesse », en vélocross, davantage de races Nordiques, à tendance endurante, en attelage) mais aussi par l'effort imposé dans chaque catégorie (participation à l'effort généralement plus importante du coureur humain en vélocross, charge à trainer plus importante en attelage malgré la participation de plusieurs chiens).

En ce qui concerne la distance globale parcourue sur l'ensemble du Trophée, on remarque qu'elle est nettement inférieure aux distances généralement parcourue lors d'épreuves d'endurance sur neige en conditions extrêmes, notamment les courses de traineau à chiens. L'effort global imposé aux chiens sur cette compétition se situe donc à l'interface entre le sprint et la course d'ultra-endurance. Nous pouvons qualifier ces exercices physiques d'efforts sous maximaux (l'effort maximal étant défini par une atteinte de la VO_2 max).

6. Conditions météorologiques

La météo a été stable au cours de la semaine, alternant avec quelques averses. La température extérieure était d'environ 15°C.

B. La procédure expérimentale

1. Les prélèvements

a. Pertinence du recours à un prélèvement de sang

La partie bibliographique de ce travail a permis de comprendre que le plasma et les cellules sanguines étaient capables de produire des quantités significatives d'espèces réactives de l'oxygène et contenaient un grand nombre de substances oxydables. C'est pourquoi la mise en évidence d'un potentiel stress oxydant dans cette étude s'est basée sur des prélèvements de sang.

b. Le recueil des prélèvements

Le recueil des prélèvements a été réalisé lors de la première et de la dernière étape du trophée, par ponction de la veine jugulaire. Environ 5 ml de sang étaient recueillis dans des tubes héparinés. Du sang frais était prélevé à partir de ces tubes puis placé dans des tubes Ependorf spécialement étiquetés pour l'analyse par RPE ultérieure. Après centrifugation immédiate des tubes à 5000 rpm pendant 10 minutes, le plasma était récupéré et réparti dans 3 tubes Ependorf étiquetés pour des dosages ultérieurs :

- de la paraoxonase-1 : tube « PON », plasma récupéré sur tube hépariné,
- des marqueurs biochimiques : tube « Enzymo », plasma récupéré sur tube hépariné,
- 1 tube supplémentaire de réserve lorsque la quantité de plasma était suffisante.

Les prélèvements de sang frais destinés à l'analyse RPE étaient ensuite immédiatement réfrigérés (+ 4°C), et les prélèvements de plasma, congelés (-20°C).

A l'occasion ce ces prélèvements, les chiens étaient soumis à un examen clinique succin (mesure de la fréquence cardiaque, évaluation de l'état d'hydratation et mesure de la température rectale).

Figure 19 : Matériel utilisé pour le prélèvement des échantillons

[TISSIER M., 2010]

Figure 20 : Matériel utilisé pour le prélèvement et la conservation temporaire des échantillons

[TISSIER M., 2010]

Figure 21 : Centrifugeuse utilisée au cours des expériences

[TISSIER M., 2010]

De par leur qualité non acceptable (plasma hémolysé, quantité insuffisante de plasma), notons que certains échantillons n'ont pas été analysés. Ils n'apparaissent alors pas dans les tableaux bilans.

2. Les techniques d'analyse biologiques utilisées

a. Dosage de la paraoxonase-1(PON-1) [THIEBAULT J.J, 2008]

La technique de dosage décrite est celle employée au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Sud de Rennes et adaptée de la méthode décrite par Eckerson [ECKERSON et al., 1983].

La PON-1 est une estérase qui catalyse la transformation du paraoxon en p-nitrophénol et diéthylphosphate en présence de calcium ionisé. Le p-nitrophénol est un dérivé coloré dont l'apparition est détectée en spectrophotométrie d'absorption atomique (à 405 nm).

Le dosage de la PON-1 se fait à 37°C dans un tampon Tris-Hcl 20 mmoles, de pH 7,8 et contenant 2,5 mmol/L de paraoxon. L'augmentation de la densité optique (DO) à 405 nm est proportionnelle à l'activité de la PON-1 et une unité internationale de PON-1 correspond à une nanomole de p-nitrophénol formée par minute et par millilitre de sérum.

b. Mesure de la plasticité membranaire érythrocytaire par résonnance paramagnétique électronique (RPE)

Bien que difficile d'abord, cette méthode offre l'avantage de pouvoir directement travailler sur des érythrocytes intacts lavés, l'hémoglobine étant « muette » en RPE. Il s'agit de la seule méthode permettant de mesurer des flux radicalaires *in vivo* [VILLAMENA F.A., ZWEIER J.L., 2004], [YUE QIAN S., WANG H.P., SCHAFER F.Q., BUETTNER G.R., 2000].

(1) La théorie de la RPE

Des corps au repos, sans influence d'un champ magnétique sont définis par leur état de dégénérescence (orientation aléatoire des spins). Le mouvement de l'électron se caractérise par un moment angulaire J, résultante du moment angulaire orbital L (ou mouvement de rotation de la particule autour du noyau) et du moment angulaire de spin S (ou mouvement de rotation de la particule sur elle-même). Ainsi, toute particule chargée en rotation sur elle-même crée son propre champ magnétique local. Par ailleurs, le moment angulaire total J étant non nul, la particule se comporte comme un dipôle magnétique. Ainsi, le moment angulaire du spin électronique est associé à un moment magnétique du spin noté μ_e défini par [THIEBAULT J.J, 2008] :

$$\mu_e = - g \beta_e S$$

Où : g est le facteur spectroscopique de Landé,
β_e le magnéton de Bohr
S le moment angulaire intrinsèque de l'électron

En l'absence de champ magnétique externe H, les moments de spin sont orientés au hasard dans l'espace ; on parle d'état de dégénérescence quantique.

En présence d'un champ magnétique externe H, continu et uniforme, les moments magnétiques s'orientent parallèlement ou anti parallèlement à H créant ainsi deux niveaux d'énergie distincts ou états de Zeeman. Ceci correspond à une levée de dégénérescence du nombre quantique de spin ; tous les champs magnétiques émis par les électrons des sondes présentes s'orientent parallèlement ou antiparallèlement au champ artificiellement créé (Figure 22). Les électrons ne sont alors caractérisés plus que par leurs vibrations.

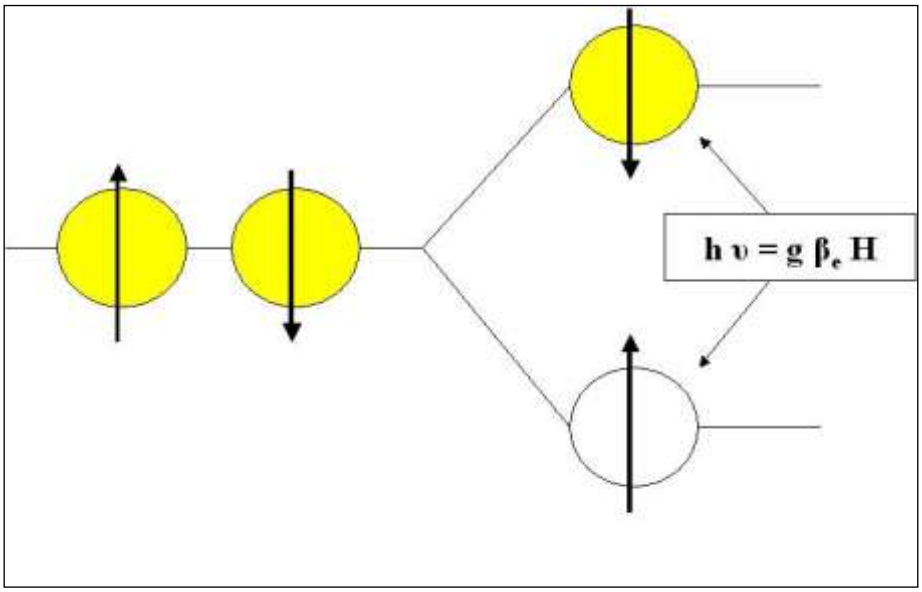


Figure 22 : Levée de dégénérescence sous l'effet d'un champ magnétique H [D'après THIEBAULT J.J, 2008]

L'énergie E de ces niveaux correspond à :

$$E = - \mu_e H = g \beta_e S H$$

S pouvant prendre deux valeurs : - ½ ou + ½ qui correspondent respectivement à une orientation parallèle ou anti parallèle du moment magnétique par rapport au champ magnétique H.

La différence d'énergie ΔE existant entre les deux niveaux est définie par :

$$\Delta E = g \beta_e H$$

Cette distribution des spins électroniques est modifiée lorsque le champ magnétique est couplé à une onde électromagnétique de fréquence n et d'énergie $\Delta E = h \nu = g \beta_e H$ où h est la constante de Planck. La transition des spins électroniques d'un niveau énergétique inférieur vers un niveau supérieur et inversement est alors possible. L'état de résonance est alors atteint. Les probabilités de transition de spin d'un niveau d'énergie inférieur vers un niveau supérieur (soit une absorption d'énergie) ou inversement (soit une émission d'énergie)

sont identiques. Cependant, le niveau d'énergie inférieur étant le plus peuplé, le résultat global le plus probable est une absorption d'énergie. L'irradiation d'un échantillon par une onde électromagnétique permet alors d'accéder à ce phénomène de résonance (absorption d'énergie) en faisant varier le champ magnétique artificiel afin de faire vibrer les électrons à la même fréquence que l'onde émise. L'onde électromagnétique a une fréquence très élevée, de l'ordre du Giga Hertz. Elle est produite à une valeur fixe par un Klystron ou une diode Gun [PORTIER K., 2007]. La spectrophotométrie permet d'obtenir une traduction visuelle de ce phénomène de résonance.

La saturation du système est observée lorsque la différence de population entre les niveaux d'énergie s'annule sous l'effet d'une irradiation électromagnétique ΔE trop intense. Dans des conditions expérimentales correctes, on fixe la puissance de l'irradiation à une valeur telle que les conditions de saturation ne soient pas atteintes [THIEBAULT J.J, 2008]. .

(2) Application pratique à l'appréciation de la fluidité et de l'ordre membranaire des érythrocytes

Les sondes :

On utilise, comme sondes extrinsèques, des analogues structuraux d'acides gras ; les acides nitroxydes ou doxyl stéariques (Figure 23), susceptibles de venir s'insérer dans la couche lipidique membranaire :

- le 16 doxyl acide stéarique (16-DS ou 16-NS),
- le 5 doxyl acide stéarique (5-DS ou 5-NS).

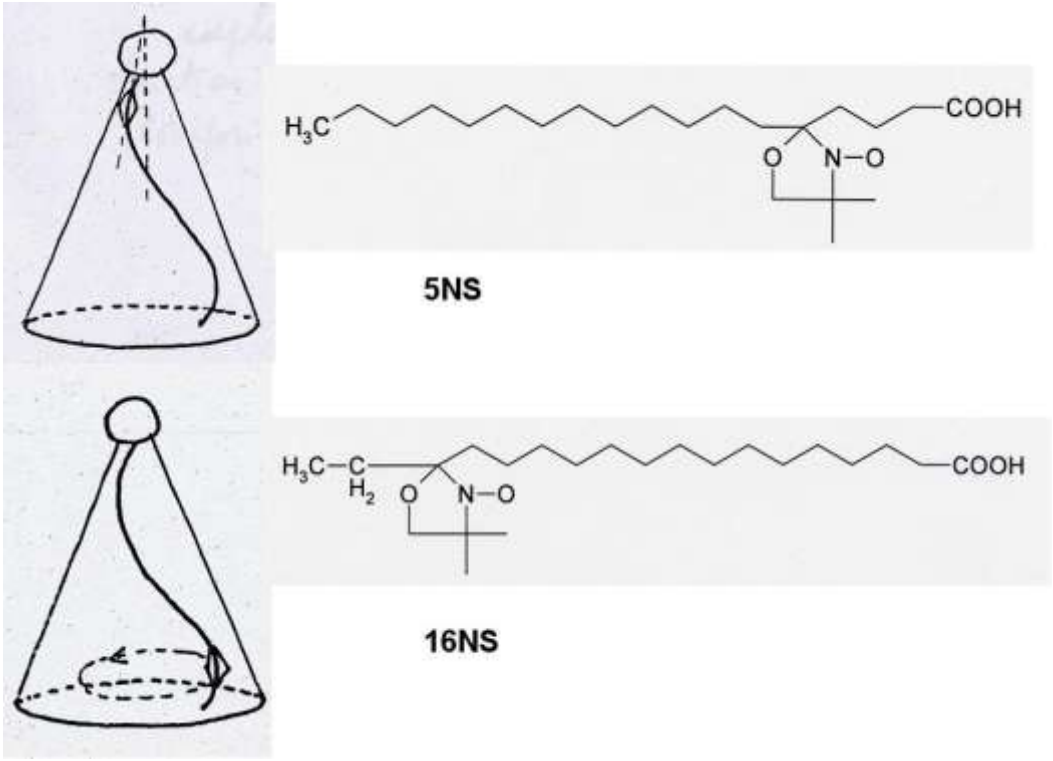


Figure 23 : Les sondes 16-NS et 5-NS [D'après THIEBAULT J.J, 2008]

La sonde 16-NS, sonde paramagnétique, est constituée d'un acide gras saturé (acide stéarique C_{18}) sur lequel est greffé au niveau du carbone 16 un radical nitroxyde, pentagone piégeant en son sein un électron célibataire (Figure 23). Il s'agit d'un hétérocycle azoté saturé, oxazolidine, possédant une liaison N-O d'une part, et des substituants qui assurent la liaison avec les systèmes biologiques étudiés d'autre part. Cette sonde va se localiser près du centre de la bicouche lipidique, permettant ainsi d'explorer la région hydrophobe de la membrane (exploration de la notion de dynamique membranaire). La liaison N-O est caractérisée par un électron célibataire principalement localisé sur l'atome d'azote qui possède un spin nucléaire l=1. La sonde est donc assimilable à un radical inoffensif puisque l'électron est enfermé dans une « cage » et ne peut donc réagir avec son environnement. En absence de radicaux libres, la sonde est le seul élément paramagnétique présent dans la membrane. L'introduction de la sonde dans la membrane n'induit pas de perturbation majeure car il s'agit d'un acide gras saturé. Notons, cependant, que la quantité de sonde incorporée ne doit pas être trop importante dans le but de minimiser ces risques de perturbations. Avec un spectrophotomètre possédant une cavité résonante performante, le rapport molaire sonde/lipides était d'environ 1/400 dans nos manipulations. La sonde s'incorpore très rapidement le long des autres phospholipides membranaires et le radical nitroxyde se trouve au niveau de la zone d'interface de la bicouche, à l'endroit où les mouvements sont les plus importants.

Par ailleurs, si on greffe le radical sur le carbone 5 (sonde 5NS) au lieu du 16, on pourra observer ce qui se passe au niveau des têtes des phospholipides, proches de la région polaire, portion hydrophile de la membrane (exploration de la notion de degré d'ordre).

Au bilan, le 16 NS est utilisé pour l'exploration de la dynamique de membrane et le 5 NS pour l'exploration du degré d'ordre [THIEBAULT J.J, 2008]. .

Dans cette étude, nous nous intéressons surtout à la dynamique de la membrane érythrocytaire dans la mesure où elle est la zone cible de l'ion superoxyde $O_2^{\bullet -}$. Par conséquent, la sonde paramagnétique utilisée est une sonde 16 NS.

Si l'on place les sondes dans un champ magnétique artificiel important (4 milliteslas), on observe une levée de dégénérescence (Figure 22). L'irradiation des sondes par une onde électromagnétique permet alors d'accéder à l'état de résonance en faisant varier le champ magnétique artificiel. Par spectrométrie, on obtient un spectre représentant la variation de l'absorption en fonction du champ magnétique statique pour une fréquence fixée. Lorsque la sonde est libre, elle possède un spectre propre. Lorsqu'elle est incorporée dans la membrane, le spectre prend une allure différente.

L'analyse des spectres obtenus par RPE :

Les spectres sont lus en dérivée première afin d'améliorer le rapport signal sur bruit. En général, on observe trois raies de résonance, une principale au milieu et deux latérales qui correspondent à l'environnement atomique (carbone, azote, oxygène) de l'électron piégé dans la cage nitroxyde. En effet, il existe trois valeurs différentes de champs magnétiques pour lesquels le système d'électrons non appariés entre en résonance. On ne peut pas cumuler le spectre de la sonde libre et celui de la sonde liée à la membrane, il faut donc faire un marquage qui assure que toutes les sondes placées en contact des globules rouges sont liées aux membranes (en moyenne 1 sonde pour 1000 phospholipides). L'avantage de cette technique est que l'hémoglobine n'est pas visible, on peut donc travailler sur les globules rouges intacts, sans détruire la membrane [PORTIER K., 2007].

La largeur de la raie de résonance obtenue est inversement proportionnelle à un temps caractéristique appelé temps de corrélation-relaxation Tc. Par ailleurs, le temps de corrélation-

relaxation **Tc est inversement proportionnel à la fluidité membranaire.** Il correspond au temps réel que met un phospholipide pour se déplacer dans la membrane ou un acide gras pour « battre ». Les mouvements de la sonde 16 NS peuvent être schématisés par un cône. Tc est le temps que met la sonde pour parcourir un radian (57°) du cercle du cône. S'il existe beaucoup de contraintes au sein de la membrane, la sonde va être gênée dans son mouvement. Si le cône est très large, cela signifie que la sonde a peu de contraintes. La sonde tourne très vite donc Tc est faible. Plus Tc est élevé, moins la fluidité membranaire est importante et inversement [PORTIER K., 2007].

La largeur des raies et leur amplitude permettent d'obtenir une valeur de T_c via la relation (Figure 24) :

$$T_c = 6.5\ 10^{-10}\ \omega\ (\sqrt{h_0/h_{-1}} + \sqrt{h_0/h_{+1}} - 2)$$

Où h_0, h_{-1} et h_{+1} correspondent à l'amplitude des trois raies observées et ω à la largeur de la raie principale exprimée en mT avec T_c exprimé en nanosecondes.

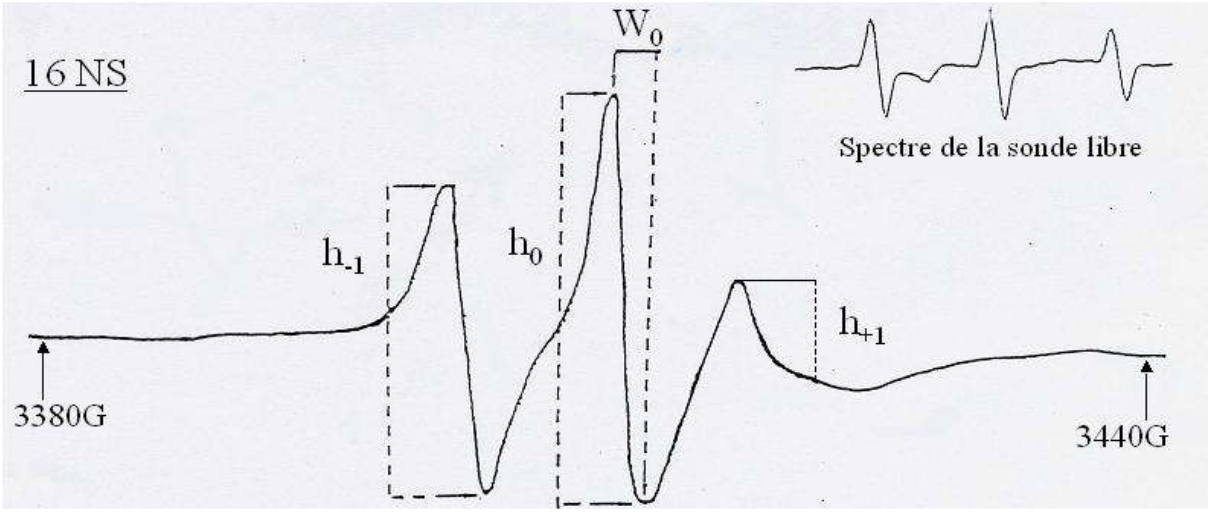


Figure 24 : Détermination du temps de corrélation-relaxation T_c à partir d'un spectre obtenu par RPE [D'après THIEBAULT J.J, 2008]

Réalisation pratique et prélèvement :

La détermination de la fluidité membranaire par RPE est évaluée sur des globules rouges intacts. Les érythrocytes sont isolés à partir de sang frais recueilli sur Héparinate de Litium par centrifugation à 12°C pendant 5 minutes à 3500 t/min, puis aspiration du plasma et du manteau leucocytaire. Les érythrocytes sont ensuite rincés à l'aide d'une solution tampon (PBS, pH de 7,4), à trois reprises. L'étape suivante consiste en une dilution au ½ de 100 µl du culot globulaire dans 100 µl de tampon PBS. 2µl de la solution de 16-NS (ou de 5-NS) est alors ajouté à l'échantillon. Le tout est agité au Vortex durant 15 secondes puis réparti dans deux tubes capillaires en quartz Vitrex, à hauteur de 20 µl chacun. Les tubes capillaires en quartz ont été choisis sans écho de spin. Les tubes sont scellés avec de la pâte Critoseal puis placés dans un tube de quartz introduit dans la cavité résonante du spectromètre de RPE [THIEBAULT J.J, 2008]. .

Le matériel utilisé était un spectromètre *BRUKER ECS 106®* possédant une cavité résonante de type Tmh 259 (Wissembourg France) (Figure 25) dont les caractéristiques étaient les suivantes :

- Champ magnétique : balayage de 3430 à 3560 Gauss en 60 secondes,
- Fréquence de l'onde irradiatrice : 9,56 GHz,
- Puissance de l'onde : 2mW,
- Modulation d'amplitude : 2,87 Gauss,
- Gain : 2 105
- Nombres de spectres accumulés par échantillon : 10

Les mesures ont toutes été faites à la température du laboratoire, de l'ordre de 20°C. Les mesures de hauteur de raies et de largeur de la raie centrale ont été faites à l'aide du logiciel d'exploitation BRUKER. Tous les réactifs, et notamment les sondes, provenaient de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier France).

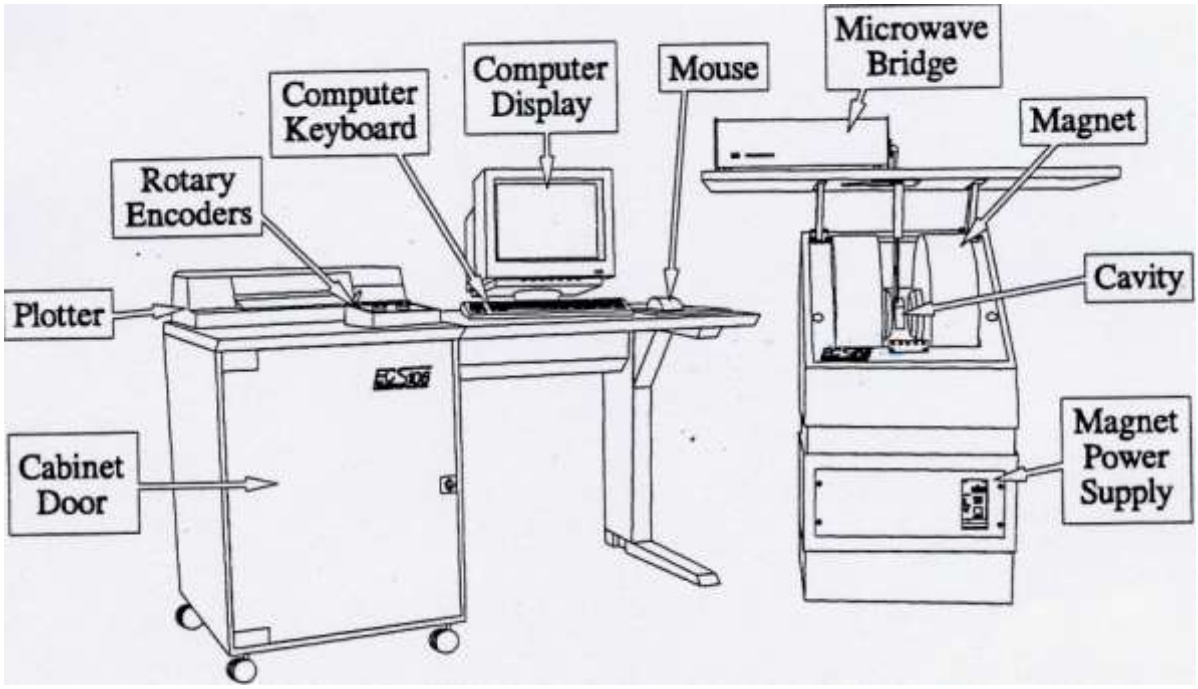


Figure 25 : Schéma synoptique du spectromètre de RPE [D'après THIEBAULT J.J, 2008]

Notons que la quantité de solvant apporté lors du marquage (1% du volume de l'échantillon total) ne perturbe pas la structure membranaire et que l'incorporation de la sonde de par sa nature d'analogue structural d'acide gras est immédiate (de l'ordre de quelques secondes). Par ailleurs, la quantité de sonde a toujours été telle qu'il n'y avait pas de sonde libre après marquage. Cette précaution est essentielle car la sonde libre possède un spectre propre pouvant se surajouter au spectre de l'échantillon marqué et ainsi rendre toute mesure irréalisable [D'après THIEBAULT J.J, 2008].

C. L'analyse statistique

L'analyse statistique des données obtenues a été réalisée par le logiciel R (*R Development Core Team* (2009)). Ces données ont été testées avec un test non paramétrique de Wilcoxon des rangs signés pour la comparaison de moyennes sur séries appariées de variables quantitatives. Une différence significative était rapportée lorsque $p < 0,05$. Le recours au test non paramétrique du coefficient de corrélation de rangs de Spearman a été utilisé pour apprécier la corrélation entre certaines variables. Une corrélation significative était rapportée lorsque $p < 0,05$.

II. Résultats

Durant la suite de l'exposé, nous utiliserons les abréviations suivantes :

- To, le temps de prélèvement avant épreuve,
- Tt, le temps de prélèvement après épreuve,
- A, premier jour de prélèvement,
- B, seconde journée de prélèvement, soit 7 jours après le jour A.
- C*x*, chien numéro *x*

A. Bilans biochimiques

1. Valeurs de référence

Les dosages ont été réalisés avec l'aide de l'automate Konélab v 7.1.2, au laboratoire de biochimie de l'ENVL, le 16 novembre 2010.

Les unités de mesure et les valeurs usuelles retenues pour l'interprétation des bilans sont les suivantes ;

- teneur plasmatique en alanine transférases (ALT) : 15 – 90 UI/L
- activité plasmatique de l'aspartate amino-transférase (AST) : 10 – 50 UI/L
- bilirubinémie totale (BILI TOTAL): 0 – 10 µmol/L
- calcémie totale (CALC) : 2,3 -2,7 mmol/L
- cholestérolémie (CHOL) : 2,74 – 9,50 mmol/L
- activité plasmatique de la créatine kinase (CK) : < 460 UI/L
- chlorémie (CL): 108 – 131 mmol/L
- créatininémie (CREA): 60 – 128 µmol/L
- teneur plasmatique en gamma-glutamine transférase (GGT) : 0 – 6 UI/L
- glycémie (GLUC): 3,5 -6,5 mmol/L
- kaliémie (K): 3,8 – 5,2 mmol/L
- teneur plasmatique en LDH (LDH): < 1000 UI/L
- natrémie (NA): 143 – 168 mmol/L
- teneur plasmatique en phosphatases alcalines (PAL) : < 180 UI/L
- phosphorémie (PHOS) : 0,6 – 2,6 mmol/L
- protéinémie totale (PROT) : 55 – 75 g/L
- triglycéridémie (TRIGLY): 0,5 – 1,22 mmol/L

- urémie (UREE) : 3 – 9 mmol/L

2. Bilans biochimiques avant course

a. Données

Tableau 7 : Bilans biochimiques à T0 A

Chien	ALT	AST	BILI TOTAL	CALC	CHOL	CK	CL	CREA	GGT	GLUC	K	LDH	NA	PAL	PHOS	PROT	TRIGLY	UREE
C1	37	18	2.7	2.51	4.1	83	118	71	7.9	6.2	3.9	22	149	32	1.25	55	0.55	5.7
C2	69	37	2.9	2.59	6.6	64	114	72	4.1	6.0	4.7	60	148	36	1.15	48	0.56	7.3
C3	32	20	3.2	2.75	7.4	153	113	78	8.0	7.5	4.2	160	151	169	0.96	47	0.72	9.7
C4	35	17	2.5	2.59	6.8	76	114	68	4.2	5.9	4.9	53	149	18	1.04	48	0.46	5.5
C5	44	17	3.0	2.53	8.8	74	108	66	3.5	6.0	4.5	48	148	32	1.07	45	0.57	5.5
C6	21	41	7.9	2.69	8.7	189	114	91	3.5	5.9	4.7	165	152	26	0.67	52	0.39	4.4
C7	45	44	3.1	2.61	4.9	139	109	73	5.5	6.5	3.9	52	146	56	1.10	44	0.67	7.9
C8	51	36	4.3	2.40	3.8	113	109	63	7.3	6.7	3.8	150	148	39	1.11	58	0.59	7.8
C10	43	29	3.4	2.46	5.0	118	114	64	7.6	5.8	4.1	69	152	70	1.10	58	0.69	6.7
C11	14	23	2.9	2.58	4.9	77	109	54	3.2	6.8	4.0	99	146	12	1.52	47	0.38	5.8
C12	34	19	4.5	2.57	6.0	64	114	70	2.3	5.3	3.9	98	149	42	1.24	45	0.68	3.9
C13	53	38	5.8	2.58	4.2	155	108	84	3.4	4.4	4.4	127	145	56	1.12	73	0.95	8.8
C14	43	28	2.5	2.33	5.3	171	98	80	3.9	5.1	3.9	61	131	36	1.14	65	0.48	6.0
C15	23	21	3.6	2.59	4.8	94	110	60	2.6	6.0	4.6	94	147	61	1.32	68	0.41	4.4
C16	48	28	3.8	2.55	4.8	111	111	79	4.4	6.0	4.2	116	147	44	1.10	75	0.35	5.2
C17	50	33	3.5	2.57	4.5	238	113	83	6.9	5.4	3.8	83	148	33	1.26	59	0.35	8.5
C18	42	28	3.3	2.74	5.2	135	111	66	3.9	5.9	4.4	84	149	79	1.52	64	0.47	6.0
C19	23	25	2.4	2.61	5.0	272	111	62	6.7	6.3	4.5	71	146	34	1.16	59	0.40	5.7
C20	33	32	4.2	2.53	4.6	105	114	86	4.9	5.6	4.1	99	149	22	0.90	79	0.47	5.2
C21	19	27	4.6	2.72	5.6	93	113	53	6.4	5.5	4.5	198	149	49	0.98	73	0.56	4.4

En rouge, les valeurs de mesure supérieures aux valeurs usuelles
En vert, les valeurs de mesures inférieures aux valeurs usuelles

b. Conclusions

Quelques variations par rapport aux valeurs usuelles classiquement utilisées sont à noter en ce qui concerne certaines variables des bilans biochimiques effectués avant l'effort :

- ✓ 9 chiens sur 20 présentaient une hypoprotéinémie avant effort.
- ✓ 7 chiens sur 20 présentaient une majoration de la teneur plasmatique en gamma-glutamyl-transférase, compatible avec une légère choléstase. Cependant, la normalité des paramètres hépatiques (ALT, AST, PAL) rend cette hypothèse peu probable ou de faible importance clinique.
- ✓ L'hyperglycémie observée sur 3 chiens pourrait être révélatrice d'un stress lors de la contention.
- ✓ La moitié des chiens prélevés présentaient une hypotriglycéridémie non significative.

3. Bilans biochimiques après effort

a. Données

Tableau 8 : Bilans biochimiques à Tt A

Chien	ASAT	CK	CL	CREA	GLUC	K	LDH	NA	PT	UREE
C1	33	150	113	72	5,4	4,1	226	148	60	6,2
C2	40	224	110	79	5,1	4,6	66	**142**	**54**	**9,0**
C4	24	112	112	76	6,0	4,4	55	147	56	5,3
C5	20	102	110	73	5,6	4,3	51	146	**54**	7,3
C6	38	121	111	89	5,2	4,5	130	146	57	5,8
C7	48	259	110	84	5,9	4,2	186	151	**53**	**9,5**
C8	40	155	110	72	6,2	**3,8**	76	148	58	**9,3**
C10	27	149	113	67	4,5	**3,8**	90	151	56	8,3
C11	28	134	109	59	**9,2**	**3,6**	70	145	**52**	6,5
C12	28	108	110	84	5,0	4,2	118	146	**49**	4,2
C13	44	216	111	87	5,6	4,1	166	149	61	**10,1**
C14	40	251	114	98	5,9	4,3	235	150	59	8,0
C15	27	106	111	76	**7,0**	4,3	66	149	57	5,4
C16	43	187	111	104	6,3	3,9	224	149	63	5,6
C17	44	311	115	88	5,4	**3,5**	182	150	**53**	**9,9**
C18	34	162	111	83	5,8	4,5	116	149	57	7,2
C19	28	125	114	77	6,2	3,9	139	149	**51**	6,6
C20	40	181	111	87	5,5	**3,7**	210	147	63	6,0

En rouge, les valeurs de mesure supérieures aux valeurs usuelles
En vert, les valeurs de mesures inférieures aux valeurs usuelles

Tableau 9 : Bilans biochimiques à T0 B

Chien	ASAT	CK	CL	CREA	GLUC	K	LDH	NA	PT	UREE
C1	20	111	113	68	**6,5**	3,9	103	150	58	4,6
C2	15	75	113	80	6,0	4,2	40	149	**55**	7,8
C3	15	131	111	64	6,4	4,1	107	145	**52**	7,8
C4	15	79	113	89	6,0	4,1	29	151	56	7,9
C5	12	84	115	70	6,1	**16,1**	38	148	56	6,2
C6	22	61	111	76	6,0	4,0	36	146	**53**	7,4
C7	47	241	110	65	6,0	**3,7**	86	151	56	**9,4**
C8	25	95	108	**55**	5,0	**3,7**	37	146	58	6,7
C10	32	137	111	63	6,1	**3,6**	6	148	60	6,7
C11	24	103	105	**48**	5,6	4,2	39	**143**	58	7,4
C12	16	52	109	75	6,3	4,2	25	146	**52**	5,4
C13	23	138	110	81	6,2	4,5	56	148	60	**10,6**
C14	31	134	113	91	5,6	4,2	76	151	63	8,1
C15	27	92	110	80	6,1	4,5	53	146	59	4,5
C16	29	94	109	84	6,1	4,3	31	145	61	5,9
C18	32	141	108	84	6,0	4,4	99	**143**	**53**	5,0
C19	32	230	109	65	6,1	4,7	864	**140**	68	6,4
C20	27	108	111	89	5,5	4,0	45	145	63	5,5

En rouge, les valeurs de mesure supérieures aux valeurs usuelles
En vert, les valeurs de mesures inférieures aux valeurs usuelles

Tableau 10 : Bilans biochimiques à Tt B

Chien	ASAT	CK	CL	CREA	GLUC	K	LDH	NA	PT	UREE
C1	28	134	113	73	5,1	**3,7**	96	147	**55**	4,3
C2	19	90	114	85	5,6	4,3	59	149	**54**	7,9
C3	21	117	108	67	6,0	4,0	75	140	**52**	5,8
C4	24	144	113	83	5,6	4,1	253	149	57	7,9
C6	26	84	113	78	5,0	4,0	117	149	**53**	6,2
C7	46	167	113	75	**3,0**	**3,7**	105	153	**55**	**9,9**
C8	38	132	109	69	**7,1**	3,9	91	145	64	6,7
C10	31	169	111	66	4,8	3,9	58	150	58	7,9
C11	27	136	110	**54**	**6,8**	**3,5**	140	147	58	6,8
C12	26	200	111	81	6,0	4,2	179	145	**51**	5,5
C14	76	1363	113	82	5,8	4,5	978	147	68	**9,5**
C15	28	117	111	85	**6,5**	4,4	50	147	59	5,2
C16	34	107	110	97	**8,6**	4,0	78	145	59	6,1
C18	42	200	110	95	**7,3**	4,6	244	145	56	5,3
C19	26	138	111	84	6,3	4,4	64	146	**53**	6,2
C20	33	115	114	94	5,5	4,2	202	149	65	5,6

En rouge, les valeurs de mesure supérieures aux valeurs usuelles
En vert, les valeurs de mesures inférieures aux valeurs usuelles

Concernant l'évolution de paramètres marqueurs de dommages musculaires que sont l'activité plasmatique de la CK et de l'ASAT, la répartition des données peut être représentée de la façon suivante (Figure 26 et 27) :

Figure 26 : Répartition du logarithme de l'activité plasmatique de la CK au cours des 4 temps de prélèvement

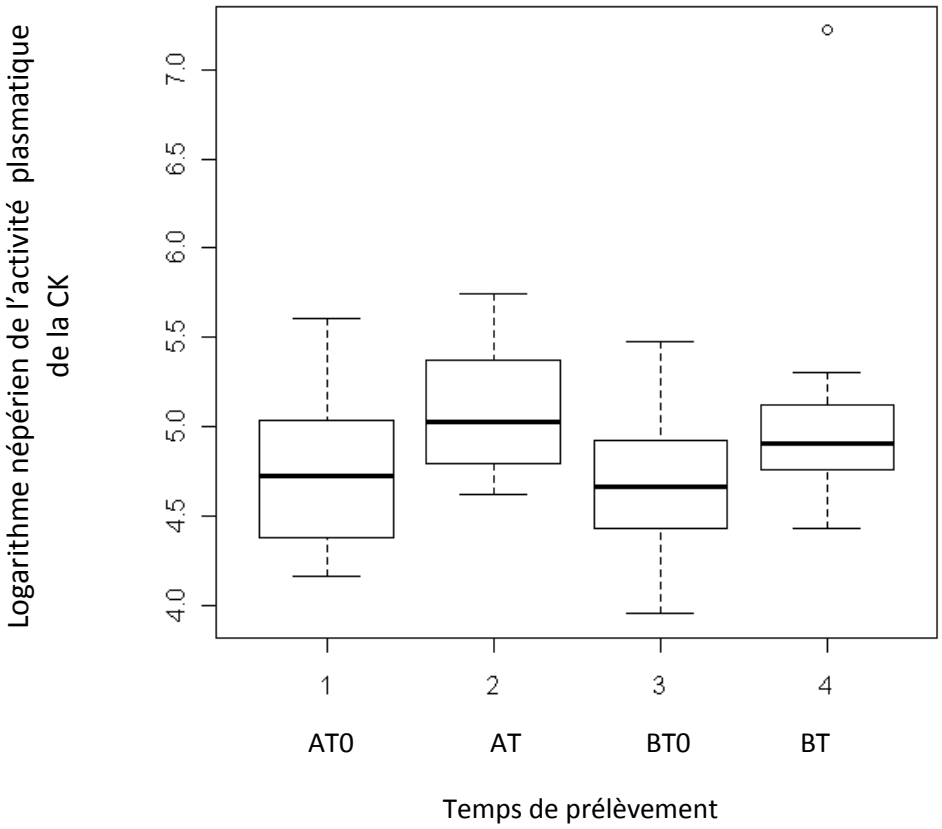
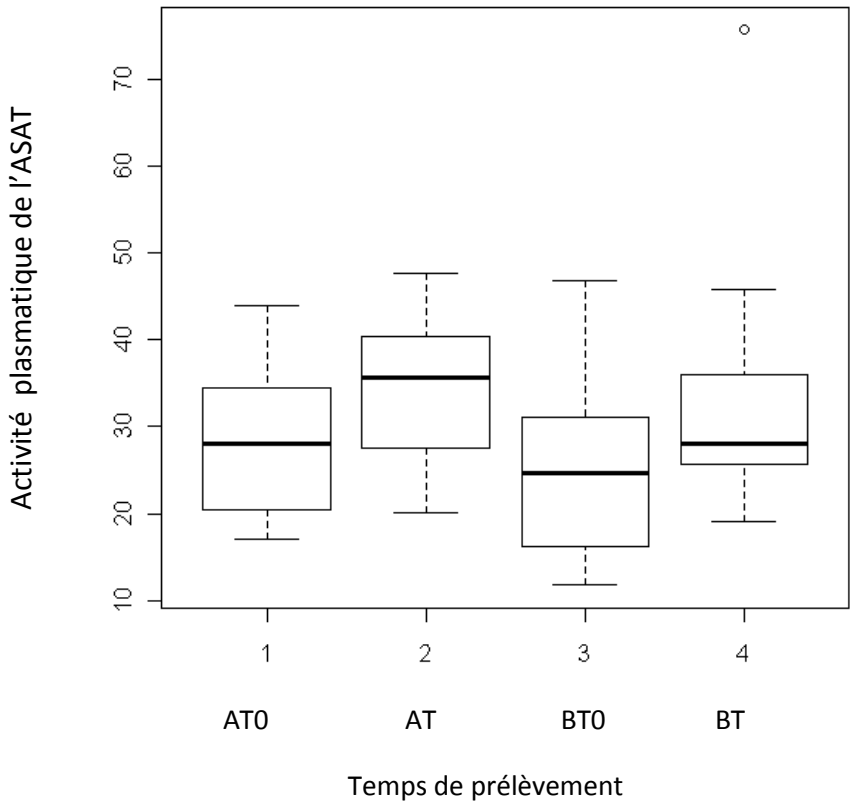


Figure 27 : Répartition de l'activité plasmatique de l'ASAT au cours des 4 temps de prélèvement



b. Conclusions

Une analyse statistique a été effectuée sur les variables des bilans biochimiques. Celle-ci a permis de mettre en évidence :

- une élévation significative de l'urémie au cours de l'étape A, c'est-à-dire entre le temps AT et le temps AT0 ($p < 0,01$),

- une élévation significative de la créatininémie au cours des étapes A ($p < 0,01$) et B ($p < 0,05$) et entre le début et la fin du trophée ($p < 0,01$), c'est-à-dire entre le temps AT et le temps AT0, entre le temps BT et le temps BT0 et entre les temps AT0 et BT.

- une élévation significative de l'activité plasmatique de la CK au cours de l'étape A ; c'est-à-dire entre le temps AT et le temps AT0 ($p < 0,01$), de 42,95 UI/L en moyenne.

- une élévation significative de l'activité plasmatique de la CK au cours de l'étape B ; c'est-à-dire entre le temps BT et le temps BT0 ($p < 0,05$),

- une élévation significative de l'activité plasmatique de l'ASAT au cours de l'étape A ; c'est-à-dire entre le temps AT et le temps AT0 ($p < 0,01$), de 6,09 UI/L en moyenne.

- une élévation significative de l'activité plasmatique de l'ASAT au cours de l'étape B ; c'est-à-dire entre le temps BT et le temps BT0 ($p < 0,01$),

- une élévation significative de l'activité plasmatique de l'ASAT entre la fin de la dernière étape et le départ du trophée; c'est-à-dire entre le temps BT et le temps AT0 ($p < 0,01$),

- une corrélation significative entre les activités plasmatiques de l'ASAT et de la CK aux instants AT (coefficient de corrélation de 0,89 pour un $p < 0,01$) et BT0 (coefficient de corrélation de 0,71 pour un $p < 0,01$),

Le cumul des différentes étapes du Trophée Sud Bourgogne ne semble pas affecter l'activité plasmatique de la CK.

Notons que :

- l'élévation de l'urémie peut s'expliquer par un état de déshydration ou par une augmentation du catabolisme protéique [GUILLET R., GENETY J., 1973].
- l'élévation de la créatininémie au cours de l'effort peut s'expliquer par une hypovolémie modérée, faisant suite à une déshydratation. Cependant, les valeurs mesurées aux quatre temps de prélèvement restent dans les valeurs usuelles, même après l'effort. Il semble donc abusif de parler d'hypovolémie dans le cas de notre étude.
- l'hypoproténinémie observée sur plusieurs chiens au repos est retrouvée au cours des bilans biochimiques réalisés après effort, pas nécessairement sur les mêmes individus.

B. Dosage de la paraoxonase-1 (PON-1)

Tableau 11 : Résultats des dosages de l'activité de la PON-1

Sujet	Etapes			
	Etape A (24/10/2010)		Etape B (31/10/2010)	
	T0 (Avant l'épreuve)	T (Après l'épreuve)	T0 (Avant l'épreuve)	T (Après l'épreuve)
C1	**322,582**	**219,118**	**329,525**	**305,15**
C2	**428,255**	**364,338**	**427,213**	**431,736**
C3	**259,642**	**Non dosé**	**276,881**	**275,853**
C4	**388,333**	**372,055**	**400,365**	**342,792**
C5	**378,147**	**371,863**	**82,105**	**Non dosé**
C6	**296,047**	**497,199**	**312,52**	**316,012**
C7	**368,29**	**400,312**	**363,551**	**452,146**
C8	**256,085**	**331,305**	**341,809**	**318,573**
C10	**392,611**	**356,973**	**372,341**	**307,157**
C11	**255,996**	**281,788**	**304,353**	**346,823**
C12	**293,226**	**300,751**	**314,566**	**318,691**
C13	**336,176**	**362,129**	**371,906**	**Non dosé**
C14	**309,445**	**245,924**	**381,729**	**310,233**
C15	**172,384**	**185,5**	**206,279**	**204,494**
C16	**222,323**	**232,304**	**272,424**	**264,15**
C17	**293,682**	**316,552**	**Non dosé**	**Non dosé**
C18	**211,967**	**226,046**	**253,6**	**146,698**
C19	**241,282**	**238,004**	**225,133**	**259,919**
C20	**284,586**	**277,736**	**300,727**	**279,781**
C21	**230,688**	**Non dosé**	**Non dosé**	**Non dosé**
Moy générale	**297,09**	**309,994**	**307,613**	**305,013**
Moy Vélocross	**321,539**	**329,754**	**356,328**	**342,345**
Moy Attelage	**277,08**	**290,234**	**289,367**	**275,977**

En **bleu,** les chiens ayant participé au Trophée en dominante « Attelage ».
En **rouge**, les chiens ayant participé au Trophée en dominante « Vélocross ».

La représentation graphique de l'évolution de l'activité de la PON-1 au cours des quatre temps de prélèvement (Figure 26) illustre la relative stabilité de ce paramètre qui, a première vue, ne semble pas ou peu affecté par la succession des efforts sous maximaux imposés à notre population d'étude.

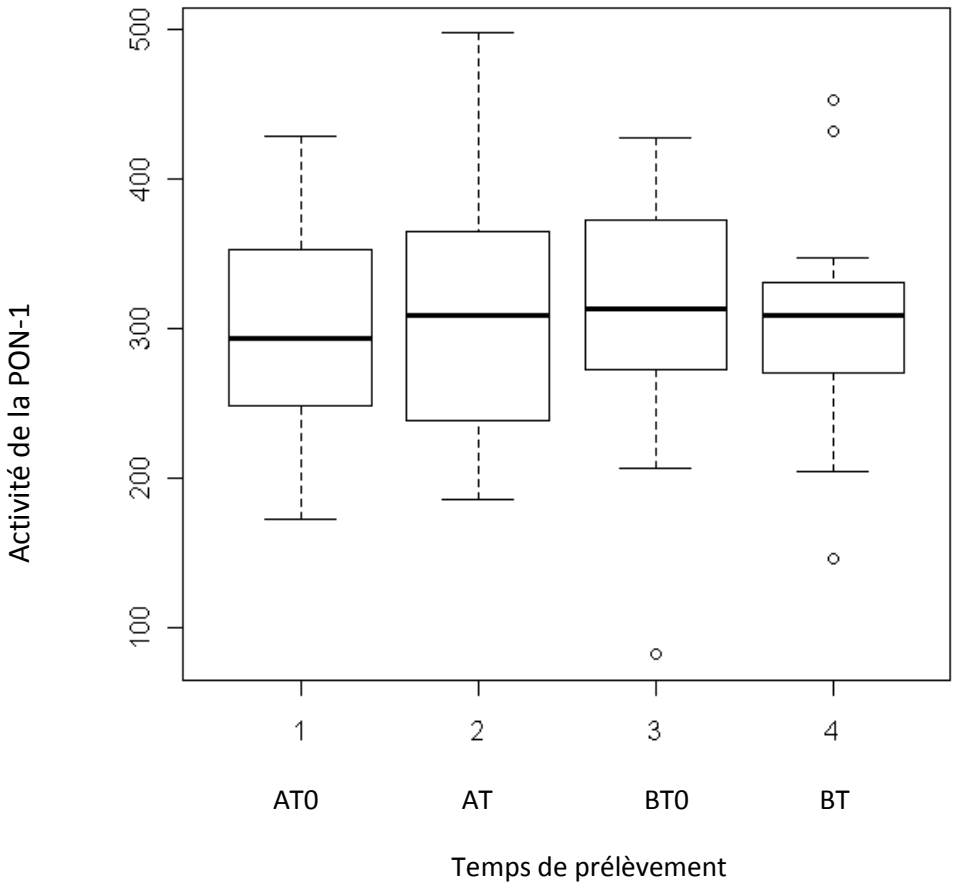


Figure 28 : Répartition de l'activité de la PON-1 au cours des 4 temps de prélèvement
(Les traits pleins gras représentent la médiane de répartition de l'activité de la PON-1 pour chaque temps de prélèvement)

L'analyse statistique n'a pas permis de mettre en évidence de modification significative de l'activité de la PON-1 au cours des épreuves A et B de même qu'entre la toute fin et le début du Trophée (c'est-à-dire entre BT et AT0).

Le test de conformité à une moyenne « théorique » (572 UI, moyenne calculée par MOTTA et al. (2009) sur l'effectif de chiens utilisés au cours de leur étude) a permis de mettre en évidence une différence significative entre cette moyenne « théorique » et celle de notre étude au temps AT0 (c'est-à-dire au début du Trophée) (moyenne de 297 UI +/- 32,12) ($p = 2{,}34.10^{-13}$).

C. Mesure du temps de corrélation-relaxation T_C à partir de spectres de RPE

Tableau 12 : Résultats des mesures du temps de corrélation-relaxation Tc

Sujet	Etapes			
	Etape A (24/10/2010)		Etape B (31/10/2010)	
	T0 (Avant l'épreuve)	T (Après l'épreuve)	T0 (Avant l'épreuve)	T (Après l'épreuve)
C1	**1,59**	**1,56**	**Non mesuré**	**5,22**
C2	**3,58**	**3,60**	**5,50**	**5,16**
C3	**2,57**	**Non mesuré**	**6,17**	**5,07**
C4	**4,59**	**1,35**	**6,33**	**5,85**
C5	**3,64**	**2,40**	**6,13**	**Non mesuré**
C6	**2,36**	**2,35**	**6,34**	**3,42**
C7	**3,35**	**4,38**	**5,40**	**4,72**
C8	**3,44**	**3,28**	**5,32**	**5,07**
C10	**2,75**	**3,14**	**5,11**	**5,01**
C11	**1,99**	**3,91**	**4,82**	**5,46**
C12	**3,15**	**1,95**	**6,04**	**5,14**
C13	**4,95**	**4,44**	**5,98**	**Non mesuré**
C14	**4,64**	**4,25**	**5,18**	**5,14**
C15	**4,17**	**2,27**	**4,91**	**4,20**
C16	**4,12**	**3,97**	**4,58**	**3,19**
C17	**4,35**	**3,44**	**Non mesuré**	**Non mesuré**
C18	**3,38**	**2,25**	**4,98**	**3,27**
C19	**3,46**	**2,52**	**6,17**	**3,23**
C20	**3,24**	**3,56**	**5,14**	**5,31**
C21	**3,34**	**Non mesuré**	**Non mesuré**	**Non mesuré**
Moyenne générale	**3,43**	**3,04**	**5,53**	**4,65**
Moyenne vélocross	**3,69**	**3,35**	**5,52**	**5,2**
Moyenne Attelage	**3,22**	**2,72**	**5,55**	**4,23**

En **bleu,** les chiens ayant participé au Trophée en dominante « Attelage ».
En **rouge**, les chiens ayant participé au Trophée en dominante « Vélocross ».

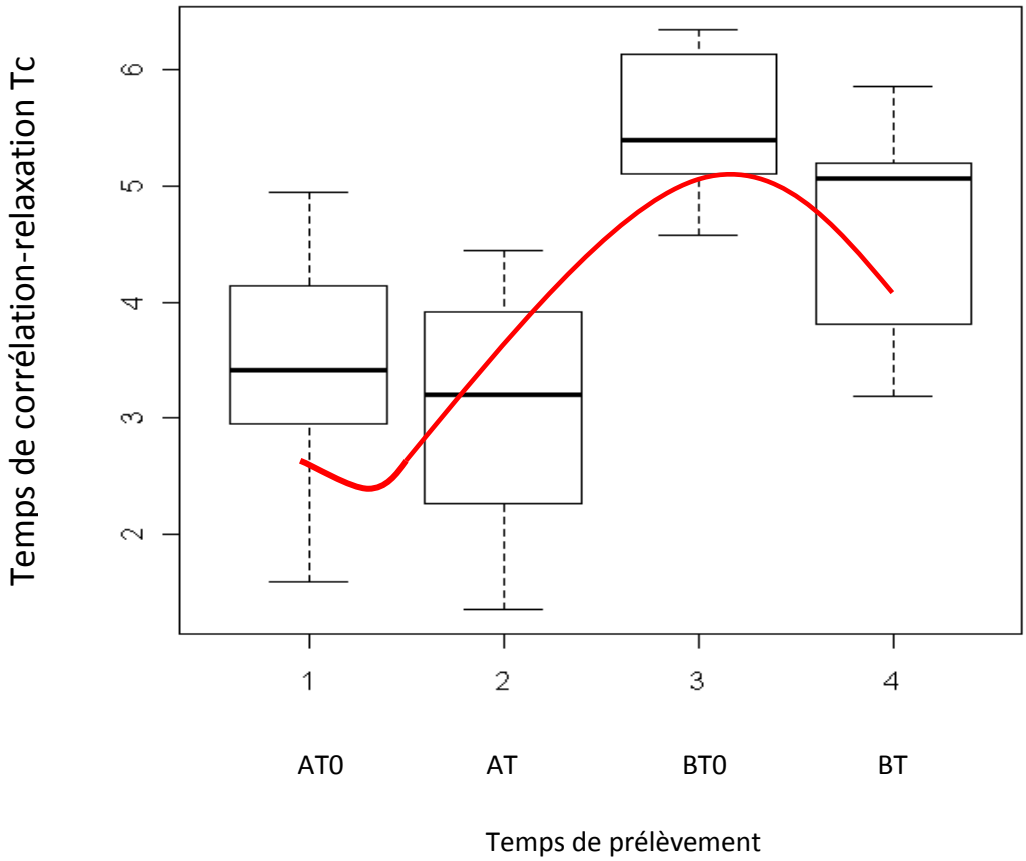


Figure 29 : Répartition du temps de corrélation-relaxation Tc au cours des 4 temps de prélèvement

(Les traits pleins gras représentent la médiane de répartition du Tc pour chaque temps de prélèvement. La courbe rouge représente la tendance évolutive de la rigidité membranaire érythrocytaire)

La fluidité membranaire évoluant inversement proportionnellement au temps de corrélation-relaxation, l'évolution des données tend à montrer une diminution de la fluidité membranaire entre le début et la fin du trophée mais une augmentation de la fluidité au cours des étapes A et B (Figure 26).

L'analyse statistique des données a permis de mettre en évidence :

- une diminution significative du temps de corrélation-relaxation Tc au cours de l'épreuve B, c'est-à-dire une augmentation significative de la fluidité membranaire érythrocytaire entre les temps BT0 et BT, pour tous les chiens confondus,

- une augmentation significative du temps de corrélation-relaxation Tc entre la toute fin du Trophée et le début des épreuves, c'est-à-dire une diminution significative de la fluidité membranaire érythrocytaire entre les temps AT0 et BT, pour tous les chiens confondus,

- une diminution significative du temps de corrélation-relaxation Tc au cours de l'épreuve B, c'est-à-dire une augmentation significative de la fluidité membranaire érythrocytaire entre les temps BT0 et BT, pour les chiens à dominante « Attelage »,

- une augmentation significative du temps de corrélation-relaxation Tc entre la toute fin du Trophée et le début des épreuves, c'est-à-dire une diminution significative de la fluidité membranaire érythrocytaire entre les temps AT0 et BT, pour les chiens à dominante « Vélocross ».

III. Discussion

A. Les biais du protocole

1. Le biais d'échantillonnage

L'échantillonnage de cette étude reste faible, notamment en raison de contraintes techniques. La présence de seulement deux manipulateurs rendait difficile la réalisation des prélèvements de plus d'une vingtaine de chiens avant et après une épreuve. Cela était d'autant plus vrai que la durée des étapes était relativement courte. Les heures de départ échelonnées de chaque concurrent nous imposaient des contraintes horaires supplémentaires. Dans l'objectif de prélever les individus immédiatement après leur arrivée, il était impossible de majorer l'échantillonnage.

L'absence de tirage au sort et l'introduction, dans l'échantillon, uniquement de chiens de coureurs volontaires peut être à l'origine d'une non représentativité de l'échantillon.

Le recours à des chiens de particuliers génère une imprécision due à l'hétérogénéité de la population ; les individus prélevés n'étaient pas soumis aux mêmes programmes d'entrainement et ils ne recevaient pas la même ration alimentaire. De plus, l'intervention de chiens de race et d'âge différents limite aussi la comparaison possible d'un individu à l'autre.

2. Le biais de mesure

Dans cette étude, cela concerne la qualité du prélèvement et la méthode d'analyse de laboratoire utilisée. En ce qui concerne les conditions de conservation des prélèvements, elles ont pu être différentes entre les étapes A et B. En effet, nous utilisions du matériel (réfrigérateurs et congélateurs) généreusement prêté par certains coureurs disposant de camping-cars ou d'habitations à proximité du départ et de l'arrivée de la course.

B. Confrontation des résultats

Evolution de l'activité plasmatique de la CK :

Concernant l'évolution de l'activité plasmatique de la CK, notre étude a permis de mettre en évidence une augmentation significative de ce paramètre au cours des efforts sous maximaux que constituent les étapes A et B du TSB. Les travaux de McKENZIE E. et al. (2007), MOTTA et al. (2009) et THIEBAULT J.J. et al. (2009) ont observé cette même tendance sur des chiens entrainés ou non réalisant des efforts sous maximaux de durée et d'intensité variables. L'augmentation significative de l'activité plasmatique de la CK peut être corrélée à une souffrance musculaire accompagnant l'effort physique ou l'hyperthermie

associée. En effet, une augmentation de l'activité plasmatique de la CK reflète des dommages au niveau de la membrane de la cellule musculaire causés par un stress mécanique ou par la peroxydation lipidique induits par l'effort physique [VOLFINGER, 1994]. Notons, cependant, que les valeurs mesurées se situent dans les valeurs usuelles. Par ailleurs, il semble que le cumul des différentes épreuves du Trophée ne semble pas entrainer d'élévation significative de l'activité plasmatique de la CK entre le début et la fin de la compétition. En effet, l'augmentation significative de ce paramètre est toujours notable immédiatement après l'effort, même après la succession de plusieurs jours d'efforts et sur des chiens relativement « sportifs ». Dans notre étude, les valeurs de l'activité de la CK restant globalement dans les valeurs usuelles, nous pouvons penser que ce paramètre est un marqueur précoce de la souffrance musculaire mais que cette souffrance musculaire semble « régulée » par l'organisme malgré le cumul de plusieurs efforts physiques sous maximaux sur plusieurs jours de compétition. Nous pouvons donc avancer deux hypothèses quant à cette observation :

- le caractère « sportif » de notre population d'étude contribue à une adaptation de l'organisme,
- le dosage a été effectué trop tôt par rapport au pic de l'activité plasmatique de la CK, observable autour de 3 à 7 heures suivant l'effort.

Evolution de l'activité plasmatique de l'ASAT :

L'augmentation significative de l'activité plasmatique de l'ASAT au cours des étapes A et B et entre le début et la toute fin du TSB (dont les mesures restent, malgré tout, dans les valeurs usuelles pour l'ensemble des chiens) pourrait refléter l'instauration débutante d'une cytolyse musculaire. Cependant, l'absence de différence significative entre les mesures de l'activité de l'ASAT aux instants BT et AT, de même qu'entre les instants BT0 et AT0 laisse penser que les sujets parviennent à contrebalancer les effets délétères des efforts physiques successifs sur la cellule musculaire squelettique. On ne note pas de « potentialisation » de l'activité des ASAT au cours de la semaine de compétition. Le caractère « sportif » de notre population d'étude pourrait, là encore, être mis en avant pour expliquer cette observation.

Corrélation ASAT/CK :

L'existence d'une corrélation entre les activités plasmatiques de l'ASAT et de la CK, mise en évidence sur deux des quatre temps de prélèvement, laisse penser que l'augmentation de l'activité de l'ASAT a essentiellement pour origine, une augmentation de son activité musculaire (par rapport à l'activité hépatique de l'ASAT), signant des perturbations essentiellement musculaires.

Hypoprotéinémie du chien de sport :

Concernant presque la moitié des individus prélevés, l'hypoprotéinémie observée, retrouvée avant et après l'effort pourrait s'expliquer par :

- un apport protéique alimentaire insuffisant. Précisons que, notre population d'étude recevait une alimentation adaptée au chien de sport. On peut penser que l'apport protéique était suffisant et de bonne qualité.
- une hypervolémie induite par l'entrainement, un catabolisme et/ou des pertes protéiques (digestives ou urinaires) accentuées à l'effort. En effet, ces hypothèses ont été avancées par plusieurs études qui ont mis en évidence cette « hypoprotéinémie du chien de sport » :
- Une étude réalisée sur 10 chiens Alaskans entrainés parcourant durant 5 jours successifs 160 kilomètres par jour, [McKENZIE E., JOSE-CUNILLERAS E., HINCHCLIFF

K.W., HOLBROOK T.C., ROYER C., PAYTON M.E., 2007] a mis en évidence une globulinémie moyenne basale (avant effort) faible (2,2 g/L +/- 0,3 g/L), hypoglobulinémie d'autant plus marquée après l'effort.

- Une étude réalisée sur 117 chiens parcourant une course d'ultraendurance de 100 miles, a mis en évidence une augmentation substantielle de la proportion de chiens avec une globulinémie inférieure ou égale à 2,2 g/L après la course. Cette hypoglobulinémie semble persister plusieurs semaines après la course [Mc KENZIE E., LUPFER C., BANSE H., HINCHCLIFF K., LOVE S., NELSON S Jr, 2010].

- Une étude réalisée sur 42 chiens de traineau parcourant durant 5 jours consécutifs 100 miles par jour a permis de mettre en évidence une augmentation de la perméabilité gastrique à l'origine d'une fuite protéique. Il semblerait que cette tendance soit d'autant plus marquée chez des chiens non entrainés mais que cette tendance ne dépende pas de la distance parcourue [DAVIS M., WILLARD M., WILLIAMSON K., ROYER C., PAYTON M., STEINER J.M., 2006].

Evolution des marqueurs directs et indirects du stress oxydant :

Evolution de l'activité de la PON-1 :

En ce qui concerne le paramètre PON-1, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence d'évolution significative de l'activité de cette enzyme au cours des différentes épreuves du TSB, contrairement à ce qui a été observé au cours des études de MOTTA S. et al. (2009) et de THIEBAULT J.J. et al. (2009) chez des chiens non entrainés (diminution significative de l'activité de la PON-1 à la suite d'un effort sous maximal). Cependant, précisons que, dans ces deux études, la diminution significative de l'activité de la PON-1 a été mise en évidence 24 heures après un effort sous maximal isolé. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés au post effort immédiat et au cumul de plusieurs jours d'effort. De plus, dans notre étude, le recours à des chiens régulièrement entrainés pourrait justifier le fait que nous n'observons pas d'évolution significative de la PON-1. En effet, bien que l'étude réalisée par THIEBAULT J.J et al. (2009) observe une diminution significative de l'activité de la PON-1 24 heures après un effort sous maximal imposé après 15 jours d'entrainement, cette tendance est moins évidente lorsque l'effort est imposé après 45 jours d'entrainement. Cependant, il est important de préciser que le recours à une population hétérogène et n'ayant pas suivi le même protocole d'entrainement que celui exposé dans l'étude de THIEBAULT J.J et al. (2009) limite la comparaison objective des résultats. En dépit de l'existence d'un stress oxydant induit par l'effort (démontré, dans notre cas, par les autres paramètres au cours de l'étape B et entre le début et la toute fin du TSB), l'organisme parviendrait à contrebalancer la production d'espèces réactives de l'oxygène en maintenant son activité paraoxonasique à un niveau raisonnable alors que l'activité antioxydante de la PON-1 a tendance à être inhibée par l'existence d'un stress oxydant induit par l'effort [THIEBAULT J.J, MOTTA S., ROPERT M., LETELLIER C., MOTTA C., LeTREUT A., 2009]. Il semble que la PON-1 soit dotée d'une capacité antioxydante « mobile » utile pour contrebalancer le stress oxydant induit par l'effort chez des espèces à haut métabolisme aérobie comme le chien [MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, 2009].

Cependant, l'hypothétique corrélation entre l'évolution de l'activité de la PON-1 et l'entrainement est à nuancer. En effet, THIEBAULT J.J. et al. (2009) rapportent que, chez l'homme, l'activité de la PON-1 ne dépendrait pas du caractère sédentaire ou sportif de l'individu mais serait modulée par un polymorphisme génétique.

Concernant l'activité de la PON-1 au repos, la confrontation de nos résultats avec ceux d'une étude réalisée par MOTTA S. et al. (2009) a permis de mettre en évidence des différences significatives quant aux valeurs basales de ce paramètre. Il apparaît difficile de définir des valeurs usuelles. Plusieurs explications peuvent être présentées quant à cette observation :

- l'activité basale de la PON-1 pourrait dépendre du type de chien (état d'engraissement, race). En effet, l'étude de MOTTA S. et al. (2009) s'intéressait à des chiens de race Beagle tandis que notre étude a rassemblé différents types raciaux de chiens.
- le recours à des protocoles expérimentaux différents aurait une influence notable sur la valeur de l'activité de la PON-1 ainsi mesurée,
- l'activité basale de la PON-1 pourrait être influencée par l'entrainement. En effet, l'étude de MOTTA S. et al. (2009) s'est intéressée à des chiens sédentaires tandis que notre étude s'est intéressée à des chiens plutôt « sportifs ».

Evolution de la fluidité membranaire érythrocytaire :

L'augmentation significative du temps de corrélation-relaxation Tc (inversement proportionnel à la fluidité membranaire érythrocytaire) entre le début et la fin du TSB appuie les résultats des études publiées par MOTTA S. et al. (2009) et THIEBAULT J.J. et al. (2009).

Puisqu'il existe une corrélation entre la rigidité membranaire et l'étendue de la peroxydation lipidique (CAZZOLA R. et al., 2004), nos résultats sont en faveur de l'existence de dommages oxydatifs induits par l'exercice sur les membranes érythrocytaires. Le stress oxydant induit par l'effort altère les propriétés rhéologiques des globules rouges [SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., KOCER G., OZKAYA Y.G., YESILKAYA A. et al., 2005]. La diminution significative de la fluidité membranaire après plusieurs jours d'efforts sous maximaux pourrait être corrélée à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène. Les productions radicalaires répétées tout au long des épreuves semblent avoir fini par rigidifier les membranes des érythrocytes.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine d'une rigidification de la membrane érythrocytaire chez l'homme [BRUN J.F., CONNES P., VARLET-MARIE E., 2007] :

- la lactatémie : dans notre étude, il aurait été judicieux de suivre ce paramètre aux quatre temps de prélèvement réalisés pour apprécier l'impact potentiel de ce paramètre sur la fluidité membranaire.
- l'existence de dégâts traumatiques infligés aux érythrocytes (compression plantaire chez les coureurs humains par exemple).
- l'état d'hydratation : concernant ce point, la réalisation d'examens cliniques sommaires, la mesure de l'urémie et l'appréciation macroscopique de l'hématocrite à chaque temps de prélèvement a permis de mettre en évidence un état de déshydratation, relativement modéré, chez certains sujets. Il est raisonnable de préciser que ce facteur a pu influencer nos résultats. Précisons tout de même que l'analyse statistique n'a pas permis de mettre en évidence de fluctuations significatives de la protéinémie au cours de l'effort. En effet, une hyperprotéinémie relative est parfois observée lors de déshydratation.
- une teneur membranaire importante en cholestérol : dans notre étude, l'ensemble des chiens prélevés présentaient une cholestérolémie dans les valeurs usuelles au repos. Nous pouvons donc penser que ce facteur n'a pas influencé nos résultats.

A contrario, l'augmentation significative de la fluidité observée au cours de l'étape B pourrait suggérer l'apparition d'une résistance de la membrane érythrocytaire aux phénomènes peroxydatifs induits par l'exercice après plusieurs jours de compétition [THIEBAULT J.J, MOTTA S., ROPERT M., LETELLIER C., MOTTA C., LeTREUT A., 2009]. Notons, ici, qu'une étude similaire à la nôtre, actuellement en cours de finalisation

et entreprise par Frédéric Lenzi (VetagroSup), observe la même tendance, c'est-à-dire une augmentation significative de la fluidité membranaire érythrocytaire au cours d'un effort sous maximal réalisé après 4 jours de compétition sur neige chez des chiens de traineau entrainés.

Il semblerait que les érythrocytes de chiens entrainés soient moins sensibles au stress oxydant induit par l'effort. Les attaques radicalaires seraient assez bien jugulées par les défenses de l'organisme, cela n'évitant pas, pour autant, certaines attaques sur les acides gras qui peuvent alors se fragmenter avant que ne se forment des pontages moléculaires réellement rigidifiants. Ce mécanisme pourrait expliquer une augmentation transitoire de la fluidité membranaire immédiatement après l'effort.

Chez l'homme, malgré l'existence d'un stress oxydant induit par l'effort, la déformabilité des érythrocytes et la teneur en hémoglobine plasmatique de sujets entrainés ne sont pas modifiés par rapport à ce qui est observé chez les sujets sédentaires. La présence d'une plus grande quantité d'érythrocytes jeunes chez les individus entrainés, adaptés davantage à réagir aux effets délétères du stress oxydant, pourrait expliquer cette moindre sensibilité des sujets entrainés [SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., KOCER G., OZKAYA Y.G., YESILKAYA A. et al., 2005].

L'accroissement de la résistance des érythrocytes au stress oxydant avec l'entrainement pourrait s'expliquer par ;

- une stimulation des activités enzymatiques érythrocytaires,
- une stimulation des systèmes non enzymatiques de défense antioxydante,
- un renouvellement accéléré des érythrocytes dont la population serait ainsi rajeunie (hypothèse privilégiée chez l'homme dans une étude de SENTURK U.K. et al. (2005)).

IV. Perspectives

Cette étude pourrait constituer une première approche de la mise en évidence de l'existence d'un stress oxydant induit par un effort de courte durée chez le chien de cross canin. Cependant, la volonté, au départ, de s'intéresser à deux populations différentes (Attelage et Vélocross) a limité l'échantillonnage de chacune et, par conséquent, une approche comparative objective des résultats obtenus.

Des travaux ultérieurs, centrés sur une population d'effectif plus important et plus homogène que la notre permettrait probablement de mettre en évidence, de façon plus prononcée, l'existence d'un stress oxydant induit par l'effort avec probablement des différences significatives entre les deux types de pratique. De même, il serait intéressant de tenter de comparer, pour un même effort de cross canin, les deux populations raciales « Chiens de type Nordique » versus « Chiens typés chasse ».

Il nous semble important de préciser quels de tels travaux seraient très intéressants si ils s'intéressaient tous au strict même type d'effort (épreuves annuelles du TSB par exemple). En effet, à la lecture des références bibliographiques concernant le stress oxydant chez le chien, il est décevant de ne pouvoir réellement comparer les études entre elles, en premier lieu, parce qu'elles se sont chacune intéressée à un effort différent. Une standardisation des protocoles expérimentaux relatifs à l'étude du stress oxydant induit par l'effort chez le chien permettrait de pallier à cet inconvénient.

V. Conclusion

Par l'appréciation de la fluidité membranaire érythrocytaire, davantage que par les autres marqueurs de stress oxydant, cette étude a permis de montrer qu'un effort maximal, de courte durée sur terre chez des chiens sportifs pouvait être à l'origine de dommages membranaires érythrocytaires, probablement par le biais d'une production d'espèces réactives de l'oxygène.

L'apparente disparité des résultats des études, s'intéressant à la mise en évidence du stress oxydant induit par un exercice de courte durée, pourrait s'expliquer par les différences de sensibilité des méthodes utilisées, par le type et l'intensité de l'effort imposé dans les protocoles expérimentaux et par l'extrême variabilité des sensibilités des sujets à l'effort.

"The same thing that makes you live can kill you in the end."

Neil Young

CONCLUSION

Lors de stress oxydant, les espèces réactives de l'oxygène sont produites en excès, les mécanismes de régulation étant dépassés. Ces espèces peuvent être à l'origine de dommages oxydatifs importants sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Depuis une trentaine d'années, des études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont permis de mettre en évidence l'implication de phénomènes de stress oxydant dans de nombreuses affections, dans le phénomène de vieillissement et la physiopathogénie de l'inflammation mais aussi au cours de l'exercice physique. Chez le chien, ces phénomènes ont surtout été mis en évidence chez le chien de traineau, au cours d'efforts d'ultra-endurance.

L'objectif de notre étude était de savoir si ces phénomènes de stress oxydant pouvaient être mis en évidence sur des efforts de plus courte durée mais de plus grande intensité, dans un contexte de conditions climatiques plus clémentes lors d'épreuves de cross canin (caniVTT et kart) échelonnées sur une durée d'une semaine (Trophée Sud Bourgogne 2010). Les résultats préliminaires de cette étude réalisée lors des première et dernière étapes de cette compétition indiquent, pour la première fois chez des chiens de sprint, le développement d'un stress oxydant significatif, comme en atteste l'évolution des paramètres suivis (enzymes musculaires, fluidité membranaire érythrocytaire) entre le début et la fin de l'épreuve ainsi qu'entre le début et la fin des étapes sélectionnées (enzymes musculaires).

Contrairement à ce qui a été observé chez des sujets sédentaires, et, conformément à des travaux publiés sur des sujets entrainé de diverses espèces (rat, chien, homme), certains paramètres ne sont pas modifiés significativement par l'effort (cas de la paraoxonase-1) voire sont significativement et momentanément améliorés (fluidité membranaire érythrocytaire à l'arrivée de chaque étape) chez nos sujets sportifs entrainés.

Ces éléments sont en faveur d'une adaptation progressive et significative des organsimes à une exposition répétée aux espèces réactives de l'oxygène générées pendant les efforts brefs et intenses caractéristiques de ces épreuves de sprint (une course de 5 à 6 kilomètres pouvant être considérée comme une course de sprint pour les athlètes ultra-endurants que sont les chiens).

Cette étude pose la question d'une supplémentation nutritionnelle ciblée en antioxydants chez les animaux participant à ce genre de compétition : celle-ci devra être suffisante pour permettre d'éviter au maximum les atteintes musculaires liées à l'action délétère d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène pendant l'effort tout en conservant les effets stimulants d'une production radicalaire contrôlée qui permettent la mise en place d'adaptations bénéfiques (fluidité membranaire érythrocytaire, résistance des membranes aux peroxydations, enzymes antioxydantes / non étudiées dans notre travail / etc…).

La variabilité des résultats observés dans la bibliographie concernant l'homme et l'animal, de même qu'au sein de notre étude peut s'expliquer par la complexité des espèces réactives de l'oxygène, par leur importante réactivité conditionnant leur faible durée de vie, par la multiplicité des méhodes expérimentales cherchant à mettre en évidence le stress oxydant ainsi que par le choix de la population d'étude.

En définitive, il semble possible de dire que l'impact du stress oxydant est d'autant plus important que l'effort est intense et prolongé et qu'il semble nettement minimisé par l'entrainement. La célèbre maxime de Paracelse « c'est la dose qui fait le poison » semble donc applicable aux espèces oxygénées réactives.

Le Professeur responsable
VetAgro Sup campus vétérinaire

Le Directeur général
VetAgro Sup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE
VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 07 NOV. 2011

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

Annexes

Annexe n°1 : fiche de renseignements pour la prise de commémoratifs

FICHE DE RENSEIGNEMENTS – N° ……..

A remplir par le coureur :

COORDONNEES DU PROPRIETAIRE :
NOM :……..
ADRESSE :……
……
……
TELEPHONE :……
MAIL : ……..

INFORMATIONS CONCERNANT L'ANIMAL :
NOM : ……..
RACE : ……..
SEXE : F / M
DATE DE NAISSANCE : ...../……../……
IDENTIFICATION (puce électronique ou tatouage) : ……
POIDS : ……kg
MODE DE VIE : Maison / Appartement / Autre :……
ALIMENTATION :
Type :……
Fréquence des repas :
- Hors compétition :……
- Avant une compétition : ……..

Complément(s) alimentaire(s) : ……
……..
ANTECEDANTS :
Médicaux :……
……
……
Chirurgicaux :……
……
……
TRAITEMENTS EN COURS :
……
……
ENTRAINEMENT :
……
……
……
……
……

INFORMATIONS CONCERNANT LA COURSE :
Distance à parcourir : ……..
Ration reçue le jour de la course et horaire d'administration : ……
……..
Classement :……
Numéro de dossard : ……

PRELEVEMENT n°1 :
DATE : ...../……../…….. HEURE : ……h……
ENVIRONNEMENT : Tp° : …… Hygrométrie : ……
COURSE :
- Distance : …… Sol : ……
- Etape : Avant la course / Fin de course (temps écoulé depuis la fin de la course : ……..)

EXAMEN CLINIQUE :
FC : ……bpm FR : ……..mpm Température rectale : ……..°C Muqueuses : R / C / Cy TRC :……..
Auscultation cardio-respiratoire : ……
Hydratation : N / D 5% / D 10%
Remarques : ……
……

PRELEVEMENT n°2 :
DATE : ...../……../…….. HEURE : ……h……
ENVIRONNEMENT : Tp° : …… Hygrométrie : ……
COURSE :
- Distance : …… Sol : ……
- Etape : Avant la course / Fin de course (temps écoulé depuis la fin de la course : ……..)

EXAMEN CLINIQUE :
FC : ……bpm FR : ……..mpm Température rectale : ……..°C Muqueuses : R / C / Cy TRC :……..
Auscultation cardio-respiratoire : ……
Hydratation : N / D 5% / D 10%
Remarques : ……
……

PRELEVEMENT n°3 :
DATE : ...../……../…….. HEURE : ……h……
ENVIRONNEMENT : Tp° : …… Hygrométrie : ……
COURSE :
- Distance : …… Sol : ……
- Etape : Avant la course / Fin de course (temps écoulé depuis la fin de la course : ……..)

EXAMEN CLINIQUE :
FC : ……bpm FR : ……..mpm Température rectale : ……..°C Muqueuses : R / C / Cy TRC :……..
Auscultation cardio-respiratoire : ……
Hydratation : N / D 5% / D 10%
Remarques : ……
……

PRELEVEMENT n°4 :
DATE : ...../……../…….. HEURE : ……h……
ENVIRONNEMENT : Tp° : …… Hygrométrie : ……
COURSE :
- Distance : …… Sol : ……
- Etape : Avant la course / Fin de course (temps écoulé depuis la fin de la course : ……..)

EXAMEN CLINIQUE :
FC : ……bpm FR : ……..mpm Température rectale : ……..°C Muqueuses : R / C / Cy TRC :……..
Auscultation cardio-respiratoire : ……
Hydratation : N / D 5% / D 10%
Remarques : ……
……

Annexe n°2 : Règlement des épreuves de canicross, caniVTT et disciplines mono-chiens de la Fédération des Sports et Loisirs Canins

REGLEMENT COURSE

EPREUVES DE : CANICROSS – CANIVTT – SKI-JOERING – CANITRAIL – CANIRANDO – CANIMARCHE – MARCHE CANINE NORDIQUE

Chapitre 1 – PARTICIPATION

1.1- LES CHIENS

1.1.1- Sont admis à participer, tous les chiens sans distinction de race et de pedigree, âgés de 12 mois au moins le jour de l'épreuve de canicross et de 18 mois au moins le jour de l'épreuve de canivtt, à l'exception des chiens de première catégorie de manière à respecter les lois en vigueur.

1.1.2- Tout organisateur peut exiger que tout chien participant à une épreuve de la Fédération des Sports et Loisirs Canins soit vacciné contre la maladie de carré et contre la parvovirose.

1.1.3- La vaccination contre la rage est obligatoire pour les régions ou départements déclarés à risque, pour les chiens venant de l'étranger et pour les chiens de deuxième catégorie. Pour les départements non déclarés comme à risque, le vaccin contre la rage ne sera pas nécessaire, mais fortement conseillé car très souvent exigé par le vétérinaire de l'épreuve.

1.1.4- Tous les chiens devront être identifiés (puce, tatouage).

1.1.5- Le vaccin contre la toux du chenil est recommandé pour les chiens vivant continuellement en chenil ou en élevage. Ce vaccin est exigé par les services sanitaires départementaux (DDPP ex DDSV) dans certains départements et lors de compétitions internationales. Attention, il existe plusieurs vaccins pour différentes toux.

1.1.6- Il peut être demandé de réaliser un examen physique des chiens par un vétérinaire de course avant le départ de la course, pour que ceux-ci soient autorisés à courir. Les concurrents participant aux épreuves avec des chiens de deuxième catégorie devront dans un même temps soumettre leur muselière à l'avis du vétérinaire et au juge de course qui valideront sa conformité à l'utilisation lors de la course.

1.1.7- Tout chien de deuxième catégorie devra être en règle avec la législation à savoir que son propriétaire, lors de son inscription, devra présenter :

- La déclaration de son chien en Mairie
- Le test de comportement
- La copie de l'attestation d'assurance Responsabilité Civile
- Le permis de détention
- Le certificat anti-rabique ou le carnet de vaccination Européen à jour
- Le certificat L.O.F.

1.1.8- Les Juges Arbitre de la Fédération des Sports et Loisirs Canins peuvent interdire l'inscription du chien pour raison valable. Le concurrent concerné se verra notifier les raisons de cette interdiction.

1.1.9- Ne seront pas admis à participer le jour de l'épreuve, sous contrôle vétérinaire :

1.1.9.a : Les chiens malades, affaiblis ou présentant un état physique incompatible à la discipline.

1.1.9.b : Les chiennes gestantes ou allaitantes.

1.1.9.c : Les chiens handicapés.

1.1.10- Un chien ou une chienne ne pourra effectuer qu'une seule course par jour. Cette interdiction s'applique à toutes les courses y compris les épreuves non inscrites au règlement de la FSLC comme les épreuves de trait (Kart, Traîneau, Trottinette, etc…). Les trois seules exceptions concernent la canimarche, les canicross enfants (moins de 15 ans), et les compétitions de Canicross (catégories adultes et juniors) prévoyant une épreuve le matin et une le soir (avec addition des temps). Pour les deux premiers cas un temps de repos de 30 minutes entre deux épreuves doit être respecté.

- Pour les Canicross enfants (catégories CE1 et CE2) un chien pourra courir deux fois dans la journée.
- Pour les compétitions comportant deux épreuves de Canicross (catégories adultes et juniors) dans la même journée, un chien pourra courir le matin et le soir à condition qu'un temps de repos soit observé entre les deux épreuves : de 3 heures minimum lorsque la première épreuve fait moins de 2km5 (course sprint) et de 6h au delà de cette distance.

1.1.11- En cas d'accident ou d'incident survenu avant qu'un chien n'ait pris le départ officiel de la course dans laquelle il est inscrit, celui-ci pourra être remplacé à condition que le substitut corresponde aux règles édictées dans les paragraphes ci-dessus (contrôle vétérinaire et âge de l'animal).
1.1.12- Les chiennes en chaleur pourront participer à l'épreuve à condition qu'elles partent en fin de catégorie pour les départs contre la montre, et en départ différé pour les départs en ligne (derrière le peloton), et que les propriétaires fassent usage d'un produit masquant les odeurs (à signaler au Directeur de course).

1.2– LES CONCURRENTS

1.2.1- La pratique du sport canin unissant un seul chien et un humain dans un même effort dans le cadre des compétitions placées sous l'égide de la Fédération des Sports et Loisirs Canins, est ouverte à toute personne, sans distinction de nationalité, ayant l'aptitude médicalement reconnue à l'effort physique. Par ailleurs, suivant certains critères de faisabilité, les épreuves placées sous l'égide de la Fédération des Sports et Loisirs Canins pourront être ouvertes aux personnes handicapées.
1.2.2- Un certificat médical d'aptitude à l'effort physique (course à pieds, cyclisme, triathlon, etc.) de moins de UN AN est obligatoire pour tout participant non adhérent à la Fédération des Sports et Loisirs Canins.
1.2.3- L'âge minimum requis est de 7 ans dans l'année civile pour le canicross et de 15 ans dans l'année civile pour le caniVTT.
1.2.4- Dans la catégorie CANICROSS ENFANT (CE), la participation ne pourra être autorisée qu'aux conditions suivantes :

1.2.4.a- Si le rapport entre la morphologie de l'enfant et la puissance du chien est compatible (contrôle Direction course). En cas contraire, l'enfant pourra courir seulement accompagné d'un adulte.
1.2.4.b- L'adulte devra être relié au chien par une longe de sécurité d'une longueur supérieure (50cm minimum) à celle de l'enfant lui permettant de contrôler à tout instant la puissance de l'animal. Cependant s'agissant de la course de l'enfant l'adulte, pendant l'épreuve, devra être placé en permanence en arrière de l'enfant sous peine de sanction. Pour les enfants de 7 à 11 ans, la prise par la main ne s'effectuera qu'en cas d'urgence.
1.2.4.c- L'enfant devra aussi être relié au chien avec l'équipement conseillé (cf. Chapitre 3).
1.2.4.d- Toute personne mineure ne peut conduire seule un chien de catégorie deux, elle devra obligatoirement être accompagnée du propriétaire muni du permis de détention (cf.
1.2.4.b).
1.2.4.e- Les parcours devront être adaptés et ne comporter aucun risque particulier.
1.2.4.f- Les enfants non expérimentés (licence à la journée) devront être accompagnés par un adulte.

1.3– LES PROPRIÉTAIRES DE CHIENS

1.3.1- Est considéré comme étant le légitime propriétaire d'un chien, celui dont le nom figure à ce titre sur la carte d'identification (réf. CERFA no 50-4447 émanant du Ministère de l'agriculture et selon les directives du décret no 91-823 du 28/08/91 contrôlées et gérées par la Société Centrale Canine).

1.3.1.a- Celui-ci est tenu de faire en sorte que l'animal lui appartenant soit en conformité avec la législation en vigueur en fonction de sa catégorie, et doit être en mesure de le justifier.
1.3.1.b- Le compétiteur est pénalement responsable des dommages occasionnés par l'animal, même si celui-ci ne lui appartient pas (article 1385 du code civil).
1.3.1.c- Il est conseillé aux propriétaires de s'assurer qu'ils sont bien couverts par une assurance responsabilité civile pour les dommages que pourrait commettre leur chien.

1.3.2- Tout accident survenu à l'occasion de la course fera l'objet d'un compte-rendu détaillé, dans les 24 heures, de la part du Juge de course ou à défaut, de l'organisateur, auprès du Président de la Fédération des Sports et Loisirs Canins ou du Secrétaire Général. Lesquels sont seuls habilités à faire une déclaration de sinistre auprès de la Compagnie d'Assurance de la Fédération des Sports et Loisirs Canins.

1.4– LES ADHÉSIONS

1.4.1 – Carte d'adhérent Compétition

1.4.1.a- Les cartes d'adhérent sont délivrées pour la période allant du 1er novembre au 31 octobre de l'année suivante.
1.4.1.b- Les titulaires d'une carte d'adhérent compétition délivrée par la Fédération des Sports et Loisirs Canins sont couverts en matière d'assurance en compétition et à l'entraînement (réf.Documents spécifiques des garanties d'assurance).
1.4.1.c- Les demandes d'adhésions sont à effectuer avec le formulaire que l'on peut se procurer auprès des clubs affiliés et sur le site de la Fédération des Sports et Loisirs Canins.
1.4.1.d- La carte d'adhérent ne sera attribuée que sur présentation du dossier complet tel qu'il est défini sur ledit formulaire.

1.4.2 – Carte d'adhérent Dirigeant. Les personnes ne pratiquant pas le canicross ou le canivtt mais exerçant d'autres activités au sein de la Fédération des Sports et Loisirs Canins ou de ses clubs affiliés (secrétaire, trésorier, directeur de course...), pourront prendre une carte d'adhérent dirigeant (formulaire commun avec la carte d'adhérent compétition).
1.4.3 – Carte découverte (à la journée). Cette carte d'adhérent est délivrée afin de permettre à des personnes non adhérentes de participer à des épreuves de la Fédération des Sports et Loisirs Canins. Elle ne saurait toutefois se substituer à la carte d'adhérent compétiteur et ne permettra pas d'être classé aux «chiens d'or » ou au championnat national FSLC.
1.4.4 – Affiliation d'une association ou d'un club à la FSLC
Les associations ou les clubs désirant être affiliés à la Fédération des Sports et Loisirs Canins doivent lui en faire la demande. Les demandes d'adhésion à la FSLC de leurs adhérents sont validées et transmises par les clubs affiliés. La période d'affiliation couvre la période annuelle des adhésions. Dans le cas d'association ou de club nouvellement créé, effectuant leur demande d'affiliation après le 1er juillet, la période d'affiliation couvrira la fin de saison en cours et la saison suivante.

1.5– LES INSCRIPTIONS

1.5.1- Dans le souci de soulager le travail des organisateurs, dans quelle catégorie que ce soit, tout adhérent de la Fédération des Sports et Loisirs Canins devra s'inscrire avant la date de l'épreuve. Toute inscription d'un adhérent effectuée le jour de l'épreuve pourra voir son prix d'inscription aligné avec celui des inscrits non licenciés.
1.5.2- Les personnes non adhérentes ont la possibilité de s'inscrire également par avance en tenant compte des délais fixés par l'organisateur. Par contre ils peuvent s'inscrire le jour de l'épreuve (inscription dite «au poteau »), si l'organisateur l'accepte et à partir du moment où ils sont en conformité avec la présente réglementation.
1.5.3- Les organisateurs peuvent refuser de prendre des inscriptions le jour de la course. Il est même conseillé de clôturer les inscriptions avant le jour de la course.
1.5.4- Les licenciés aux fédérations FFST et FFPTC, à la CNEA option canicross, seront acceptés en tant que non licenciés sauf si une convention (ou autre) est signée avec l'une d'elles.
1.5.5- Les licenciés aux fédérations étrangères affiliées à l'ECF seront acceptés en tant que licenciés.

Chapitre 2 – DISCIPLINES

2.1 – LE CANICROSS

2.1.1- Discipline ayant comme spécificité l'union d'un seul chien et d'un coureur à pieds reliés entre eux de façon bien définie, effectuant de concert le même effort physique sur un parcours tracé à l'avance. Cette discipline, ouverte aux personnes adhérentes ou non, se décompose en catégories définies ainsi :
2.1.2- Tous les ans une grille indiquant les années de naissance déterminant les catégories sera publiée sur le site Internet de la Fédération des Sports et Loisirs Canins Le changement éventuel de catégorie a toujours lieu le lendemain de la finale des « Chiens d'Or », généralement au mois de septembre. La saison se termine le jour de la finale des « Chiens d'Or » de l'année considérée. Les adhérents de la catégorie enfant2, dans la dernière année de leur catégorie, peuvent s'ils le souhaitent et sur avis favorable d'un Médecin du sport demander leur sur-classement dans la catégorie supérieure (junior). Cette demande doit être effectuée au moment de la demande de licence. Aucun changement ne sera autorisé en cours de saison. Les catégories FSLC de la saison en cours figurent en annexe au règlement. Pour les championnats FSLC, les catégories adultes doivent être représentées par cinq concurrents au départ ou trois à l'arrivée, pour être prises en compte dans les résultats. La catégorie junior doit être représentée par trois concurrents à l'arrivée. Les catégories vétérans peuvent être fusionnées en cas de nombre insuffisant de concurrents (cela sera notamment le cas pour les catégories V2 et V3 en l'absence du nombre exigé pour l'une de ces catégories).

2.2 – LE CANIVTT

2.2.1- Discipline ayant comme spécificité l'union d'un seul chien et d'un cycliste, reliés entre eux de façon définie, effectuant de concert le même effort physique sur un parcours tracé à l'avance. Un néophyte pourra souscrire une carte découverte (à la journée) (cf. chapitre 1.4.3).
2.2.2- Les catégories FSLC de la saison en cours figurent en annexe au règlement. Pour les championnats FSLC, les catégories adultes doivent être représentées par cinq concurrents au départ ou trois à l'arrivée, pour être prises en compte dans les résultats. Les catégories vétérans peuvent être fusionnées en cas de nombre insuffisant de concurrents (cela sera notamment le cas pour les catégories V1 et V2 en l'absence du nombre exigé pour l'une de ces catégories).

2.3 – LA CANIMARCHE ou CANIPROMENADE

2.3.1- Epreuve ludique proposée à toute personne ou animal n'ayant pas les capacités physiques pour effectuer un parcours en courant. Cette discipline consistera à marcher (allure libre, lente ou rapide) avec son chien sur une certaine distance.
2.3.2 – Les enfants de moins de 18 ans peuvent effectuer la canimarche, accompagnés ou non, sous l'entière responsabilité de leurs parents.
2.3.3- Dans la mesure où cette épreuve n'est pas une compétition, il ne sera pas établi de classement. Les temps seront donnés à titre indicatif. Les organisateurs auront libre choix pour les catégories et récompenses.

2.4- LA MARCHE NORDIQUE CANINE

La marche nordique canine est une discipline dont le règlement est similaire à celui du canicross à l'exception du matériel (cf. 3.5). Il s'agit d'une marche nordique (Nordic Walking) effectuée relié à son chien.

2.5- LE CANITRAIL et CANIRANDO

2.5.1- Le Canitrail ou Canirando se déroule sur des distances pouvant aller jusqu'à 20 km en une ou plusieurs étapes sur un ou deux jours. Ces épreuves peuvent être chronométrées, elles sont effectuées à allure libre, en marchant ou en courant.
2.5.2- En fonction des conditions climatiques (température principalement) un arrêt obligatoire défini par la direction de course devra être observé.
2.5.3- Les règles du canicross sont applicables à ces disciplines.

2.6 – LE SKI – JOERING

2.6.1- Le ski-joëring est une discipline sportive qui se pratique en ski de fond. Le skieur est relié à son chien comme pour le canicross.
2.6.2- Les règles du canicross ou canivtt sont applicables au ski-joëring

2.7 – LE DEPART

Il existe deux types de départ : Le départ individuel en contre la montre et le départ groupé.

2.7.1- Départ Individuel. Toutes les épreuves de CANIVTT ne peuvent se dérouler qu'en départ individuel (exceptionnellement deux par deux avec une distance en largeur de 10m minimum, ou une séparation entre les deux concurrents, sur 50m empêchant tout contact entre les deux chiens) avec, en général, un départ toutes les minutes (30 secondes minimum lorsque le nombre de concurrents ne permet pas le respect des horaires prévus par l'organisateur). L'ordre des départs est porté à la connaissance des concurrents, par affichage sur le panneau officiel. Les épreuves de canicross peuvent également se dérouler individuellement, selon le choix de l'organisateur ou si l'aire de départ ne permet pas un départ groupé dans de bonnes conditions de sécurité. La course poursuite en canicross est également assimilé au départ individuel : Les concurrents partent dans l'ordre et avec les écarts de la course précédente (le premier en premier et ainsi de suite).

2.7.2- Départ groupé. La priorité est donnée au départ groupé en canicross, il peut être global, par vagues ou par catégories, selon le nombre de participants et si le terrain le permet. Le juge arbitre de course décide éventuellement du nombre de participants par vague. Le terrain doit être suffisamment large et ne pas comporter de rétrécissement avant une centaine de mètres. Les participants ne pourront se présenter sur la ligne de départ que sur ordre du juge arbitre ou du starter.

2.7.3- Généralités pour tous les départs :
La ligne de départ doit être clairement matérialisée par une ligne tracée au sol. Quelque soit le type de départ, les concurrents doivent se présenter avec l'équipement réglementaire, leur dossard bien visible et fixé sur la poitrine pour le canicross (ou numéro fixé à l'avant pour les VTT), et se placer avec leur chien derrière la ligne tracée pour le départ.

Chapitre 3 – LE MATÉRIEL

3.1 – LES DÉBUTANTS

3.1.1- Le harnais est obligatoire dans toutes les compétitions. Pour les personnes s'initiant au CANICROSS (première participation, éventuellement inscription "sur place"), la ceinture, la laisse à amortisseur et le harnais pourront leur être loués (ou prêtés).

3.1.2- SONT INTERDITS: le collier étrangleur, le collier de dressage (dit électrique) et le collier à griffes.

3.2 – LES ADHERENTS

3.2.1- Toute personne adhérente devra posséder un matériel entièrement conforme aux paragraphes 3.3 et 3.4.

3.3 – LE MATÉRIEL DE CANICROSS ET DE CANITRAIL

3.3.1- En canicross, l'usage de chaussures de cross (munies de pointes métalliques) est STRICTEMENT INTERDIT en toutes circonstances.
3.3.2- La laisse ou longe avec amortisseur de 2 mètres maximum en extension est obligatoire.
3.3.3- Le harnais du chien devra être adapté à sa morphologie. Il devra également être confortable afin de ne pas blesser le chien.
3.3.4- Au choix le coureur devra également porter une ceinture abdominale d'une largeur de 7 cm minimum ou une ceinture sous-cutale (type baudrier) ou un cuissard avec ceinture intégrée.
3.3.5- Tout concurrent devra mettre son matériel en conformité avec les précédents paragraphes pour pouvoir prendre le départ.
3.3.6- Tous les chiens de catégorie 2 pourront participer aux différentes épreuves, à condition d'être muselés, sauf arrêté local, municipal ou préfectoral plus restrictif. Il devra s'agir d'une muselière adaptée, permettant au chien d'ouvrir la gueule, de sortir la langue, haleter, de se désaltérer, tout en gardant sa fonction sécuritaire.
3.3.7- Tous les chiens, (obligation pour les chiens de catégorie deux (cf. 3.3.6)), pourront prendre le départ munis d'une muselière adaptée, permettant au chien d'ouvrir la gueule et de boire et dont le type est semblable aux modèles validés par la FSLC (voir photos sur annexe jointe). Dans le cas d'une muselière classique (plastique, cuir, nylon, etc.…), elles seront tolérées seulement sur les 400 mètres suivant la ligne de départ, passée cette distance elles devront obligatoirement être retirées sous peine de disqualification. Les muselières dites de frappe, d'attaque ou de défense ne sont pas autorisées.

3.4 – LE MATÉRIEL DE CANIVTT

3.4.1– Seuls les vélos type Vélo Tout Terrain (VTT) sont acceptés.
3.4.2- Le port du casque cycliste (norme EN 1078) est obligatoire.
3.4.3- La laisse ou longe avec amortisseur est obligatoire, la longueur totale de la ligne de trait en extension est de 2m maximum, cette longueur est mesurée à l'aplomb de la roue avant.
3.4.4- La longe sera attachée au VTT à l'avant du cadre de façon à ne pas gêner la conduite et le fonctionnement du VTT.
3.4.4.a- La longe ne pourra être fixée au VTT par un système (type barre VTT) plus loin que l'aplomb de la roue avant.
3.4.4.b- La longe ne pourra en aucun cas être attachée sur le concurrent.
3.4.5- Le harnais du chien devra être adapté à sa morphologie. Il devra également être confortable afin de ne pas blesser le chien.
3.4.6- Le port de gants ou mitaines est obligatoire.
3.4.7- SONT INTERDITS
- 3.4.7.a- Les vélos équipés de garde-boue métallique
- 3.4.7.b- Les attaches latérales dites «springer ».

3.4.8- Tout concurrent devra mettre son matériel en conformité avec les précédents paragraphes pour pouvoir prendre le départ.
3.4.9- Lors d'une épreuve de caniVTT, les chiens de catégorie deux devront obligatoirement être muselés avec une muselière adaptée (cf. 3.3.6).

3.5 – LE MATÉRIEL DE MARCHE NORDIQUE CANINE

3.5.1- La laisse ou longe avec amortisseur d'une longueur de 2m à 2m50 en extension est obligatoire.
3.5.2- Les bâtons munis d'une pointe en acier doivent être munis d'une protection en caoutchouc. La hauteur des bâtons est choisie en fonction de la taille du concurrent, la norme actuelle applique le coefficient 0.68. Par exemple : taille 1m77 x 0.68 soit des bâtons de 1m10.

3.6 – LE MATERIEL DE SKI-JOERING

3.6.1- Le harnais pour le chien et la ceinture pour le skieur sont semblables à ceux prévus pour le canicross.
3.6.2-La laisse ou longe avec amortisseur de 2m à 3m maximum en extension est obligatoire.
3.6.3- Les skis de fond ne doivent pas comporter de danger pour le chien (pas de carres métalliques ou de spatules pointues).

Chapitre 4 – DISTANCES ET TEMPÉRATURES

4.1 – DISTANCES

4.1.1- Elles varient entre 1, et 9 kilomètres selon les catégories (distances conseillées). Ces distances peuvent être portées jusqu'à 20 kilomètres dans le cas des épreuves de Canitrail, Canirando ou de Ski-Joëring. La configuration du paysage (relief, parcours boisé ou aride), les conditions climatiques (pluie, vent) sont des critères qui permettent de rallonger ou de raccourcir un parcours. L'organisateur se doit d'adapter les distances et les horaires en fonction de la saison et des conditions météorologiques du jour. L'organisateur devra informer les concurrents et notifier ces dispositions sur les feuilles de classement en cas de modification du parcours.

4.1.2- DISTANCES PAR CATEGORIE

Cani Enfant 1 / Températures / Jusqu'à 16° / De 16° à 25° / De 25° 30°à

4.2 – TEMPÉRATURES

Ce critère est un point important. Il est primordial de respecter scrupuleusement l'allure de l'animal et de s'adapter à son rythme. Ne jamais omettre de le laisser se désaltérer sur les points d'eau et, ce qui est le plus important, le mouiller pour le rafraîchir.

4.2.1- Quelle que soit la température, il est nécessaire de prendre toutes les précautions d'usage

4.2.1.a- Point d'eau à mi-parcours si la distance est supérieure à 5 km.

4.2.1.b - Obligation de placer une douchette ou un grand bac (100 litres environ) pour tremper les chiens au départ et à l'arrivée.

4.2.1.c- A l'arrivée, l'eau devra être potable pour les chiens. Il faudra donc prévoir des récipients pour tremper les chiens (type bac à sable pour enfants) et en disposer d'autres pour étancher leur soif (type seau).

4.2.1.d- Dès que la température est supérieure à 20° un point d'eau tous les 2 km est, obligatoire. (100 litres minimum).

4.2.2- Pour une température supérieure à 25° un concurrent inscrit a la possibilité de ne pas, courir s'il estime que son chien ne supportera pas la chaleur. Il pourra se faire rembourser son inscription auprès de l'organisateur sans objection possible de celui-ci.

4.2.3- Dans le cas d'une température supérieure à 30° l'organisateur doit annuler son, épreuve ou modifier les horaires des départs en conséquence.

4.2.4- La température sera prise à moins d'un mètre du sol à plusieurs endroits du parcours. Les lieux et nombre sont déterminés par le juge arbitre de course en veillant que les emplacements ne soient pas situés sous l'action directe ou réfléchissante du soleil.

Chapitre 5 – ÉTHIQUE SPORTIVE

5.1 – LE COMPORTEMENT

Tout sportif doit adopter en toute circonstance, un comportement digne de l'éthique qu'il revendique. Ayant de surcroît connaissance de la réglementation propre à cette discipline, il se doit et s'engage par le fait de son adhésion d'entretenir constamment un esprit sportif particulier, compte tenu de la responsabilité engagée vis-à-vis de l'espèce canine et du respect qui lui est dû. Toute manifestation personnelle contraire à cette règle morale, pouvant nuire à la réputation du sport canin en général, notamment sur quelque organisation canine que ce soit, pourra entraîner des sanctions pour les adhérents de la Fédération des Sports et Loisirs Canins, et l'interdiction de participer à d'autres épreuves de la Fédération des Sports et Loisirs Canins pour les concurrents «autres ».

5.2 – LE RESPECT DE L'ANIMAL

Une seule règle prime, celle du bien-être et du plaisir du chien avant toute autre chose. Par respect pour nos compagnons, tout sera fait pour les mettre à l'honneur :

5.2.1- Dans la presse ou dans les classements des courses, le nom du chien doit obligatoirement être associé à celui du coureur. Le terme «couple » ou bien «tandem » peut y être associé.

5.2.2- Dans les titres réservés aux vainqueurs, le nom et la race du chien doivent être associés au nom du coureur.

5.2.3- Dans les championnats nationaux FSLC, le chien est aussi «champion» Il sera logique de leur attribuer des trophées (médaille ou autre) et de les faire participer aux remises de récompenses, podium, photographies avec le coureur etc. Les chiens titrés (les 3 premiers de chaque catégorie) seront présents aux remises des prix, sous réserve de l'acceptation par l'organisateur et à condition que l'environnement s'y prête.

5.3- LE RESPECT DU JUGE ARBITRE DE COURSE

Le Juge arbitre de course est un bénévole qui a un rôle important dans toutes les manifestations effectuées sous l'égide de la FSLC. Il ne se substitue pas à l'organisateur mais lui apporte ses conseils notamment pour le tracé des parcours, le balisage, l'emplacement des points d'eau, le contrôle du matériel utilisé, etc… Il veille à l'application du règlement principalement à tout ce qui concerne la sécurité. Il a un rôle de prévention et doit s'assurer que les participants soient bien informés. Les sanctions éventuelles sont appliquées avec discernement, notamment pour tous les débutants qui ne connaissent pas encore bien toutes les règles. Les participants se doivent aussi de respecter les décisions du juge qui a un rôle délicat. Toute insulte à son égard ne peut être tolérée et pourra être sanctionnée (cf art. 6.2.9.).

Chapitre 6 – PÉNALITÉS

6.1 - GÉNÉRALITES POUR TOUTES LES DISCIPLINES

6.1.1- Au départ, le chien et le compétiteur attendront derrière la ligne, uniquement sur signal du juge arbitre ou du starter
6.1.2- A l'arrivée, le temps du concurrent sera pris quand le nez du chien franchit la ligne d'arrivée.
6.1.3- Tout coureur ou cycliste peut demander au concurrent qui le précède le passage en exprimant le souhait à haute et intelligible voix (mot « PISTE »). Le concurrent dépassé ne pourra s'y opposer. Ce refus entraînera les pénalités prévues paragraphe 6.2.7.
6.1.4- Il est interdit à une tierce personne de courir à côté, derrière ou devant le « couple » afin de motiver l'animal. Même interdiction avec un cycle, un chien ou un engin motorisé..
6.1.5- Tout concurrent se présentant sur la ligne de départ sans dossard ne sera pas autorisé à prendre le départ.
6.1.6- Excepté les personnes désignées comme officielles sur l'épreuve, les personnes circulant sur le parcours devront être à l'arrêt lors du passage des concurrents. Un compétiteur ne respectant pas cette obligation ou perturbant le passage des concurrents se verra pénalisé d'une minute.
6.1.7- Les coureurs pourront reconnaître le parcours avant le départ de la première épreuve SANS LE CHIEN sous peine de sanction prévues paragraphe 6.2.10.
6.1.8- Lorsqu'un concurrent « vole le départ », une pénalité de 30 secondes lui sera infligée.
6.1.9- Le port d'oreillettes audiophoniques (style MP3 ou autre) est interdit en compétition.

6.2 – EN CANICROSS

Le chien devra être en permanence devant. La limite maximale autorisée pour le coureur est la hauteur des épaules de l'animal. Il est strictement interdit de tirer le chien, sauf pour le remettre dans le sens de la course (changement de direction, dérobade, inattention due à l'environnement immédiat tel chien de spectateur, passage de gué…). Les sanctions (pénalités, disqualification) seront applicables uniquement par le Juge arbitre de course officiant sur l'épreuve.

6.2.1- Interdiction de tirer le chien :
- 6.2.1.a- Une minute à la première infraction.
- 6.2.1.b- Exclusion à la deuxième infraction.

6.2.2- Interdiction de courir devant le chien :
- 6.2.2.a- Un avertissement à la première observation.
- 6.2.2.b- Une minute par observation supplémentaire à partir de la deuxième.

6.2.3- Pour les courses enfants, adulte placé en avant de l'enfant : une minute de pénalité à partir de la première observation.
6.2.4- Empêcher le chien de se désaltérer :
- 6.2.4.a- Une minute à la première observation.
- 6.2.4.b- Disqualification à la deuxième infraction.

6.2.5- Non respect du parcours : Disqualification lorsque le non respect du parcours est volontaire ou bien que l'erreur, due à une négligence ou inattention, apporte un avantage certain par rapport aux autres concurrents.
6.2.6- Détacher son chien (en dehors des passages délicats où l'autorisation de lâcher le chien est indiquée) : Une minute de pénalité.
6.2.7- Refus de se laisser dépasser :
- 6.2.7.a - Une minute à la première infraction.
- 6.2.7.b - Disqualification à la deuxième infraction.

6.2.8- Violence physique envers le chien ou un concurrent : Disqualification.
6.2.9- Violence verbale ou physique envers le juge arbitre de course, pénalité selon la gravité des faits pouvant aller jusqu'à la disqualification.
6.2.10- Reconnaissance du parcours avec un chien le jour de la course : Une minute de pénalité.
6.2.11- Chien effectuant plusieurs courses adultes ou juniors : Disqualification du ou des concurrents concernés.

6.2.12- Chien de catégorie deux non muselé (muselière conforme) : Disqualification.
6.2.13- Chien non catégorisé muselé avec un matériel classique (muselière nylon, cuir, etc.…) au- delà de 400 mètres après le départ : Disqualification.
6.2.14- Les pénalités sont cumulables.

6.3 – EN CANIVTT

Les sanctions sont identiques à celles de la discipline CANICROSS. NOTA: Le cycliste devra fournir un effort régulier et permanent afin de ne pas être constamment tiré par le chien.

6.3.1- Le cycliste se laisse manifestement tirer par le chien : Une minute de pénalité (pour être certifiée, cette observation devra faire l'objet de plusieurs remarques).
6.3 2- Absence de gants : Une minute de pénalité.
6.3.3- Absence de casque : Interdiction de départ (sécurité oblige).
6.3.4- En cas d'incident ne permettant pas de terminer la course sur le VTT, le concurrent peut terminer l'épreuve en courant à coté du VTT, ou en le portant sur son épaule, à condition qu'il ne gêne pas les autres concurrents.
6.3.5- Le concurrent terminant l'épreuve sans VTT ne sera pas classé.

6.4 – EN CANIMARCHE

Cette discipline pratiquée dans le même esprit de respect du chien que le canicross ou le canivtt ne peut être aussi restrictive que les précédentes.

6.5 – EN MARCHE NORDIQUE CANINE

Les pénalités sont identiques à celles du canicross (cf. 6.2) à l'exception des deux articles 6.2.2 et 6.2.11 modifiés comme suit :
6.5.2- Interdiction de courir et de marcher devant le chien :
6.5.2.a- Un avertissement à la première observation.
6.5.2.b- Une minute par observation supplémentaire à partir de la deuxième.
6.5.11- Chien effectuant une course adulte ou junior et une marche nordique canine sans un repos pour le chien d'une durée minimum de 30 minutes entre les deux épreuves : disqualification du ou des concurrents concernés. Il n'est pas autorisé pour un même chien d'effectuer une marche nordique canine, une course adulte ou junior ainsi qu'une 3ème épreuve, y compris une course enfant, dans ce cas : disqualification du ou des concurrents concernés.

Chapitre 7 – COMPÉTITIONS

Chaque épreuve placée sous l'égide de la Fédération des Sports et Loisirs Canins sera, dans la mesure des moyens disponibles, assortie d'un classement scratch et d'un classement par catégorie.

7.1 – CHAMPIONNAT NATIONAL FSLC

7.1.1- Seul un coureur adhérent à la Fédération des Sports et Loisirs Canins et ayant effectué au moins une épreuve inscrite au calendrier FSLC durant l'année précédent les championnats, pourra prétendre au titre de Champion National FSLC ou de Vice-champion National FSLC, il devra être de nationalité française.
7.1.2- Les titres seront attribués selon les modalités fixées par le règlement intérieur de la Fédération des Sports et Loisirs Canins.
7.1.3- Lors du championnat de la FSLC, un concurrent ne peut engager qu'un seul chien par discipline, un en caniVTT et/ou un autre en canicross.
7.1.4- Dans les catégories adultes, pour être titrée une catégorie doit être représentée par cinq concurrents au départ ou trois à l'arrivée. Dans la catégorie junior, pour être titrée la catégorie doit être représentée par trois concurrents à l'arrivée. La catégorie V3 intégrera la catégorie V2 en l'absence du nombre exigé pour être titrée.

7.2 – CHAMPIONNAT D'EUROPE ECF

7.2.1- Seule une fédération nationale affiliée à l'ECF peut transmettre les inscriptions aux Championnats d'Europe des concurrents de leur nationalité.
7.2.2- Pour demander à la FSLC son inscription aux Championnats d'Europe ECF, il faut être adhérent de la FSLC et avoir effectué au moins deux épreuves inscrites au calendrier FSLC durant l'année précédent les championnats.

7.2.3- Dans le cas où le nombre de demandes serait supérieur au nombre de places attribuées à la FSLC, des critères objectifs de sélection seront définis par le Comité Directeur et communiqués à l'ensemble des adhérents.

7.3 – LES « CHIENS D'OR »

7.3.1- Seul un coureur adhérent à la Fédération des Sports et Loisirs Canins, pourra prétendre être classé aux chiens d'or.
7.3.2.- Le calcul des points attribués selon le barème ci-dessous s'effectuera de la façon suivante :
7.3.2.a- Ne sont cumulés que les points acquis par le même couple COUREUR / CHIEN.
7.3.2.b- Les cinq meilleurs classements de la saison seront pris en compte pour le cumul des points.
7.3.2.c- Un bonus de 10 points sera attribué à partir de la 6ème course.
7.3.2.d- Le nombre de points maximum pouvant être obtenu est fixé à 150.
7.3.3.- C'est le classement de la finale (cumul des courses du samedi et du dimanche), qui départagera les ex aequo.
7.3.4.- En cas d'égalité après l'addition des points obtenus à la finale, les concurrents seront départagés selon les critères suivants : 1 meilleur classement à la finale, 2 nombre total de participations.
7.3.5- Un concurrent peut durant la saison participer en canicross et caniVTT avec autant de chiens qu'il le souhaite. Il peut doubler les épreuves, c'est à dire engager deux chiens MAXIMUM pour la même épreuve (par exemple courir deux fois en caniVTT lors d'une même épreuve) dans la mesure où l'organisation de l'épreuve le lui permet et avec l'accord de l'organisateur. Exception faite de la finale des Chiens d'Or (cf. 7.2.6.), un concurrent peut ainsi amener autant de chiens qu'il le souhaite à 150 points.
7.3.6- Lors de la finale des Chiens d'Or, un concurrent ayant amené plusieurs chiens à la barre des 150 points (dans la même discipline canicross ou caniVTT) devra faire le choix de son chien finaliste. Il ne peut engager qu'un seul de ses chiens par discipline, un en caniVTT et/ou un autre en canicross.
7.3.7- Seuls les adultes présents et ayant participé à l'épreuve de la finale des « Chiens d'Or » sont titrables. Pour les enfants seuls ceux ayant obtenu les 150 points peuvent prétendre aux podiums, leur absence à la finale devra être justifié.

7.4 – BARÈME DES POINTS POUR LES CHIENS D'OR
[…]

7.5 – LES CHALLENGES REGIONAUX

Des challenges régionaux pourront être organisés selon un règlement établi par les organisateurs. La dernière épreuve sera considérée comme organisatrice de la finale régionale.

7.6 – LES CHALLENGES INTER-CLUBS (ASSOCIATIONS)

Ce type de challenge sera mis en place par la Fédération des Sports et Loisirs Canins lorsque le nombre de Clubs ou Associations sera suffisamment important pour créer une compétition digne d'intérêt..

Chapitre 8 – REMISE DES PRIX

Dans la mesure du possible les chiens seront associés à la remise des récompenses. Les organisateurs veilleront à rappeler que le canicross et le canivtt sont des sports «nature », il faut donc respecter celle-ci et laisser les sites d'accueil aussi propres qu'avant la manifestation. L'avenir des épreuves suivantes et de ce sport en général en dépend. Par respect pour les organisateurs et leurs partenaires, les licenciés FSLC se doivent d'être présents lors des podiums. L'absence non excusée auprès du juge arbitre de course ou de l'organisateur sera sanctionnée par la suppression des points pour les chiens d'or.

Chapitre 9 – PUBLICATION DES RESULTATS

9.1- TRANSMISSION DES RÉSULTATS : Chaque organisateur transmettra dans les plus brefs délais les résultats complets de son épreuve, sous forme de fichier informatique (Excel ou Word), par courrier électronique adressé au responsable des Chiens d'Or de la Fédération des Sports et Loisirs Canins.

9.2- PUBLICATION DES RESULTATS :
9.2.1-Tous les classements seront publiés dans leur intégralité sur le site de la Fédération des Sports et Loisirs Canins. Ils seront officialisés dès réception par la Fédération des Sports et Loisirs Canins du rapport écrit du juge arbitre officiant sur l'épreuve et du paiement de la contribution course.
9.2.2-Le classement des Chiens d'Or sera également publié et mis à jour sur le site de la Fédération des Sports et Loisirs Canins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABUJA P., ALBERTINI R., *Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins*, Clinica Chimica Acta, 2001, 1 -17

M., LEFEBVRE HP., AUGUSTE D., VINCLAIR P., TOUTAIN PL., BRAUN JP., *Exploration musculaire chez le chien : intérêt de la mesure de la créatine-kinase. Une revue.* , Pratique Médicale et Chirurgicale des Animaux de Compagnie, 1994, 29, 165 – 173

ALBERTS, BRAY, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS, WALTER, *L'essentiel de la biologie cellulaire, Introduction à la biologie moléculaire de la cellule*, 1999, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, page 84

ASHTON T., YOUNG I.S., PETERS J.R., JONES E., JACKSON S.K., DAVIES B., ROWLANDS C.C., *Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study*, Journal of Applied Physiology, Décembre 1999,Vol 87, 2032 – 2036

BASKIN C.R., HINCHLIFF K.W., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., HAYEK M.G., CHEW B.P. et al., *Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs*, American Journal of Veterinary Research, 2000, Vol. 61, 8.

BLATT D.H., LEONARD S.W., TRABER M.G., *Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins*, Nutrition, 2001, Vol.17 (10), 799 – 805

BLOOMBERG MS., DEE JF., TAYLOR RA., *Canine sports medicine and surgery*, W.B Saunders Compagny, Philadelphia, 1998, 485p.

BODNER E., AFRI M., FRIMER A.A., *Determining radical penetration into membranes using ESR splitting constants*, Free Radical and Biology & Medicine 49, 2010, 427 – 436

BONNEFIS C., *Effets biologiques des peroxydes et approche de la participation des aliments composés à leur apport chez le chien et le chat*, Thèse de Médecine Vétérinaire, Toulouse, 2005, 87p.

BRUN JF., CONNES P., VARLET-MARIE E., *Alterations of blood rheology during and after exercise are both consequences and modifiers of body's adaptation to muscular activity*, Science & Sports 22, 2007, 251 – 266

BRUYERE H., *Physiopathologie des affections dues au stress chez le chien de sport*, Recueil de médecine vétérinaire spécial chien de sport, juillet aout 1991, 635 – 643

BURANAKARL C., TRISIRIROJ M., PONDEENANA S., TUNGJITPEANPONG T., JARUTAKANON P., PENCHOME R., *Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs*, Research in Veterinary Science 86, 2009, 309 – 313

CAZZOLA R., RONDANELLI M., RUSSO-VOLPE S., FERRARI E., CESTARO B., *Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes*, Journal of Lipid Research, 2004, Vol.45, 1846 – 1851

CELI P., SULLIVAN M., EVANS D., *The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood*, The veterinary journal 183, 2010, 217 – 218

CHANDAN K. SEN, *Oxidants and antioxidants in exercise*, Journal of applied physiology, 1995, 79 (3), 675 – 86

CHANDAN K. SEN, MUSTAFA ATALAY, AND OSMO HÄNNINEN, *Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency*, Journal of applied physiology, 1994, 77 (5), 2177 – 87

COSTES A., *Impact de la chaleur sur le travail du chien de canicross,* Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, 2010, 118p

COURTIN S., *Etude des variations des paramètres biologiques lors de l'entrainement des chiens du Centre National d'Instruction Cynophile de la Gendarmerie,* Thèse de Médecine Vétérinaire, Toulouse, 2009, 127p.

CUVELIER C.et al., *Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E*, Annales de Médecine Vétérinaire, 2003, 147, 315 - 324

DAVIS M., WILLARD M., WILLIAMSON K., ROYER C., PAYTON M., STEINER J.M., HINCHCLIFF K., McKENZIE E., NELSON S.Jr., *Temporal relationship between gastrointestinal protein loss, gastric ulceration or erosion, and strenuous exercise in racing Alaskan sled dogs*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 2006, Vol.20 (4), 835 -839

DEATON C.M., MARLIN D.J., *Exercise-associated oxidative stress*, Clinical Techniques in Equine Practice, Vol. 2, N°3, septembre 2003, 278 – 291

DELATTRE J., BONNEFONT-ROUSSELOT D., BORDAS-FONFREDRE M., JAUDON M.,-C., *Diabète sucré et stress oxydant*, Annales de Biologie Clinique, Juillet-Aout 1999, Volume 57, 4, 437-444

DENIS J., *Rehabilitation and conditioning of sporting dogs*, Veterinary Clinics Small Animal Practice 35, 2005, 1427 – 1439

Department of Kinesiology and Interdepartmental Program of Nutritional Sciences, University of Winsconsin, *Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients,* Free radical and biology and medicine, 1995, 18 (6), 1079 – 1086

DOSEK A., OHNO H., ACS Z., TAYLOR A.W., RADAK Z., *High altitude and oxidative stress,* Respiratory & Neurobiology 158, 2007, 128 – 131

DUNLAP K.L., REYNOLDS A.J., DUFFY L.K., *Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise,* Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 143, 2006, 429 – 434

FEDOROVA M., KULEVA N., HOFFMANN R., *Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress*, Biochimica et Biophysica Acta 1792, 2009, 1185 – 1193

FOURIEZ V., *Les affections musculaires chez le chien de sport*, Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, 2004, 83p

GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D., *Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?* L'actualité chimique, 2003, 91-96

GATE L., PAUL J., NGUYEN Ba., TEW K.D., TAPIERO H., *Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants*, Biomed and Pharmacother, 1999, 53, 169 – 180

GOGNY M., SOUILEM O., *Eléments de physiologie de l'effort chez le chien et le cheval,* Le Point Vétérinaire, octobre-novembre 1995, vol 27, n° 171, 13 – 21

GOSWAMI B., TAYAL D., GUPTA N., MALLIKA V., *Paraoxonase: A multifaceted biomolecule*, Clinica Chimica Acta 410, 2009, 1 -12

GRANDJEAN D., *Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien*, Le nouveau praticien vétérinaire 95, 2005, 11 – 15

GRANDJEAN D., *Le stress oxydatif cellulaire, conséquences pathologiques chez le chien*, Le nouveau praticien vétérinaire 106, 2005, 22 – 24

GRANDJEAN D., *Modèle d'étude du stress oxydatif cellulaire, le chien de travail en environnement extrême*, Le nouveau praticien vétérinaire 121, 2005, 37 – 40

GRANDJEAN D., *Prévention nutritionnelle du stress oxydatif cellulaire, antioxydants : mode ou réalité biologique ?* Le nouveau praticien vétérinaire 145, 2005, 61 – 65

GRANDJEAN D., *Stress oxydatif cellulaire chez le chien de recherche-sauvetage*, Pratique vétérinaire des animaux de compagnie, mars 2005, n°14, 3 – 6

GRANDJEAN D., *Le stress oxydatif cellulaire chez le chien : conséquences et prévention nutritionnelle*, Bulletin de l'Académie vétérinaire de France, 2001, 154, 49 – 61

GRANDJEAN D., *Pathologie du chien de sport, les affections organiques*, Le Point Vétérinaire, octobre-novembre 1995, vol 27, n° 171, 23 – 32

GRANDJEAN D., HAYMANN F., *Encyclopédie du chien Royal Canin*, Turin, Diffo Print Italia, 2010, 1003 p., p.819, 825, 841 – 857

GRANDJEAN D., MOQUET N., PAWLOWIEZ S., TOURTEBATTE AK., CACCIANI F., BACQUE H., *Guide pratique du chien de sport et d'utilité, Deuxième Edition*, Aniwa Publishing, 2002, 424p.

GRANDJEAN D., DRISS F., SERGHERAERT R., VALETTE J.P., MICHEL A., LUIGI R., *Conséquences biologiques et nutritionnelles du travail en haute altitude chez le chien de recherche, Expédition scientifique « Chiens des cimes – Licancabur 1996 »*, Recueil de Médecine Vétérinaire, 1997, 172 (11/12), 601 - 621

GRANDJEAN D., KRONFELD D.S., PRAGON B.M., *Alimentation du chien de sport et de travail*, Recueil de médecine vétérinaire, 1991, 167 (7/8), 727 – 751

GROUSSARD C., *Oxidative stress and anaerobic exercise*, Science & Sports, 2006, 62 – 67

GUILLET R., GENETY J., *Abrégé de médecine du sport*, Paris, Masson & Cie, 1973, 396 p., p.276, p.52 à 58

HALL D.M., BAUMGARDNER K.B., OBERLEY T.D., GISOFLI C.V., *Splanchnic tissues undergo hypoxic stress during the whole body hyperthermia*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver physiol., 1999, 276, G1195 – G1203

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., *Free radicals in biology and medicine, Fourth Edition*, New York, Oxford University Press, 2007, 851 p.

HAN LIERDE H., *Vadémécum biologique du vétérinaire*, Bruxelles, Prodim Editeurs & diffuseur, 1988, 612p.

HAND S., THATCHER C.D., REMILLARD R.L., ROUDEBUSH P., *Nutrition Clinique des animaux de compagnie 4e édition*, Mark Morris Institute, Topeka, Kansas, 2000, 1208p.

HERMES-LIMA M., ZENTENO-SAVIN T., *Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress*, Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133, 2002, 537 – 556

JAVILLIER M., *Traité de biochimie générale, Tome III, Les processus biochimiques de synthèse et de dégradation métabolisme des glucides et des lipides*, Masson et C^{ie} Editeurs, Paris, 1969, 823 p.

JOHNSON S.I., MCMICHAEL M., WHITE G., *Heatstroke in small animal medicine: a clinical practice review*, Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 2006, 16, 2, 112 – 119

JUNGBLUTH G., *Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine*, Thèse de Médecine Vétérinaire, Lyon, 2008, 143p

KERNBAUM S., *Dictionnaire de médecine*, Paris, Flammarion Médecine-Sciences, 1998, 1030 p.

LODISH, BALTIMORE, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, DARNELL, *Biologie moléculaire de la cellule*, DeBoeck Université, 1997, 1344 p., p.1284,

LYKKESFELDT J., *Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking*, Clinica Chimica Acta 380, 2007, 50 – 58

McARDLE A., JACKSON M.J., *Exercise, oxidative stress and ageing*, Journal of Anatomy, 2000, 197, 539 – 541

McKENZIE E., LUPFER C., BANSE H., HINCHCLIFF K., LOVE S., NELSON S Jr., DAVIS M., PAYTON M., PASTEY M., *Hypogammaglobulinemia in racong Alaskan sled dogs*, Journal of Veterinary Internal Medicine, Janv-Fev 2010, Vol. 24 (1), 179 – 184

McKENZIE E., JOSE-CUNILLERAS E., HINCHCLIFF K.W., HOLBROOK T.C., ROYER C., PAYTON M.E., WILLIAMSON K., NELSON S., WILLARD M.D., DAVIS M.S., *Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise*, Journal of American Veterinary Association, 2007, Vol.15;230 (10), 1486 – 1492

MILGRAM N.W., HEAD E., MUGGENBURG B., HOLOWACHUK D., MURPHEY H., ESTRADA J., IKEDA-DOUGLAS C.J., ZICKER S.C., COTMAN C.W., *Landmark discrimination learning in the dog: effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy*, Neuroscience and Behavioral Reviews 26, 2002, 679 – 695

MILLS P.C., SMITH N.C., CASAS I., HARRIS P., HARRIS R.C., MARLIN D.J., *Effects of exercise intensity and environnemental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse*, European Journal of Applied Physiology,1996.

MOQUET N., *Le stress oxydatif membranaire d'effort chez le chien – Impact sur le statut antioxydant et le besoin vitaminique E chez le chien de traineau en course de longue distance*, Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, 2000, 59p.

MOTTA S., LETELLIER C., ROPERT M., MOTTA C., THIEBAULT J.J, *Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraxonase-1 activity*, The Veterinary Journal 181, 2009, 288 – 295

MURRAY R.K, GRANNER D.K, MAYES P.A., RODWELL V.W., *Biochimie de Harper*, Bruxelles, Editions De Boeck Université , 2002, 933p.

NIKOLAIDIS M.G., JAMURTAS A.Z., *Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise*, Archives of Biochemistry and Biophysics 490, 2009, 77 – 84

OHIA S.E., OPERE C.A., LeDAY A.M., *Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues*, Mutation Research 579, 2005, 22 -36

PACKER L., CADENAS E., DAVIES K.J.A., *Free radicals and exercise : An introduction*, Free Radical Biology & Medicine 44, 2008, 123 – 125

PASQUINI A., LUCHETTI E., CARDINI G., *Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise*, Research in veterinary science 89, 2010, 120 – 123

PETIBOIS C., DELERIS G., *Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training*, Archives of medical Research 36, 2005, 524 – 531

PIERCY R. J., HINCHCLIFF K.W., MORLEY P.S., DISILVESTRO R.A., REINHART G.A., NELSON S.L., SCHMIDT K.E., CRAIG A.M., *Vitamin E and exertional rhabdomyolysis during endurance sled dog racing*, Neuromuscular Disorders 11, 2001, 278 -286

PORTIER K., *Effets de l'oxygénation et de l'exercice sur la fluidité membranaire de l'érythrocyte du cheval*, Thèse de doctorat d'université, Université d'Auvergne, 2007

POWERS S.K., JACKSON M.J., *Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production*, Physiol Rev., Octobre 2008, 88 (4), 1243 – 1276

QUAIN C., *Intérêt de l'étude de la lactatémie dans le suivi biologique de l'entrainement du chien de sport*, Thèse de Médecine Vétérinaire, Alfort, 2002, 92p.

QUIENNEC G., Société française de cynotechnie, *Séminaire sur le chien au travail*, Toulouse, 18 février 1987, Tome 1

R Development Core Team (2009) R : *A language and Environnemental for Statistical Computing*. R Foundation Core Team. Vienna, Austria. (ISBN 3-900051-07-0) (http://www.R-project.org)

SACHDEV S., DAVIES K. J.A., *Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise*, Free Radical and Biology and Medicine 44, 2008, 215 – 223

SACHECK J.M., BLUMBERG J.B., From the Jean Mayer USDA Human nutrition research Center on aging, Tufts University Boston, Massachussets USA, *Role of vitamin E and oxidative stress in exercise*, Nutrition, 2001, 17, 809 – 814

SENTURK U.K., GUNDUZ F., KURU O., KOCER G., OZKAYA Y.G., YESILKAYA A. et al., *Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans*, Journal of Applied Physiology, 2005, Vol.99, 1434 - 1441

SILIART B., NGUYEN F., *Le mémento biologique du vétérinaire – Répertoire alphabétique de biochimie, endocrinologie et hématologie cliniques*, Rueil-Malmaison, Les Editions du Point Vétérinaire, 2007, 318 p.

SOFFLER C., *Oxidative stress*, Veterinary Clinics Equine Practice 23, 2007, 135 – 157

STEVEN C., *Antioxidants in veterinary nutrition*, Veterinary Clinics Small Animal Practice 36, 2006, 1183 – 1198

THIEBAULT J.J., *Stress oxydant induit par des efforts sous-maximaux chez le chien : prévention nutritionnelle et influence de l'entrainement*, Thèse de Doctorat d'Université, Université, Université de Rennes 1, 2008, 361 p.

THIEBAULT J.J., MOTTA S., ROPERT M., LETELLIER C., MOTTA C., LeTREUT A., Unpublished data, *Protecting effect of Vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in progressively trained dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and Paraoxonase-1 activity*.

TRABER M.G, ATKINSON J., *Vitamin E, antioxidant and nothing more*, Free Radical and Biology and Medicine 43, 2007, 4 -15

VILLAMENA F.A., ZWEIER J.L., *Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR Spin Trapping*, Antioxidants & Redox Signaling, 2004, Vol. 6 (3), 619 – 629

VOLFINGER L., LASSOURD V., MICHAUX J.M., BRAUN J.P., TOUTAIN P.L., *Kinetic evaluation of muscle damage during exercise by calculation of amount of creatine kinase released*, American Journal of Physiology, 1994, 266, 434 - 441

WYSE C., CATHCART A., SUTHERLAND R., WARD S., Mc MILLAN L., GIBSON G., PADGETT M., SKELDON K., *Effect of maximal dynamic exercise on exhaled ethane and carbon monoxide levels in human, equine, and canine athletes*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 141, 2005, 239 – 246

YUE QIAN S., WANG H.P., SCHAFER F.Q., BUETTNER G.R., EPR detection of lipid-derived free radicals from PUFA, LDL, and cell oxidation, Free Radical Biology and Medicine, 2000, Vol. 29 (6), 598 – 579

SITES INTERNET CONSULTES

FCS. Fédération Suisse de Canicross - Schweizerischer Canicross Verband – CaniCross, CaniVTT, CaniTrotinette & CaniMarche. [en ligne]. http://www.canix-trophee.com/ [page consultée le 8/08/2010]

FIEVET E., www.france-mushing.com [page consultée le 19 octobre 2011]

LASBLEIZ Yvon. Historique du canicross en France. [document électronique]. Juin 2004. Mis à jour en 2007. http://www.fslc-canicross.net [page consultée le 3/09/2011]

Réglement des épreuves de canicross et canivtt de la Fédération des Sports et Loisirs Canins. Fédération Sports et Loisirs Canins [en ligne]. http://www.fslc-canicross.net/index.php [page consultée le 8/08/2010]

StressMarq™. Biosciences Inc. [en ligne]. www.stressmarq.com/specs [page consultée le 11 mars 2011]

TISSIER Marion

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CHIEN DE CROSS CANIN

Thèse Vétérinaire : LYON, 2011

RESUME : Le stress oxydant se caractérise par une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, potentiellement à l'origine de dommages oxydatifs sur les constituants cellulaires. Il est prouvé que le stress oxydant intervient dans de nombreuses affections et dans les lésions induites au cours de l'effort physique chez le chien, notamment au cours d'efforts d'ultra-endurance. Notre étude s'est intéressée à la mise en évidence de l'existence d'un stress oxydant au cours d'un effort de cross canin, de courte durée, sur sol non enneigé. Entre autres analyses, l'étude de la fluidité membranaire érythrocytaire par résistance paramagnétique électronique (RPE) et le dosage de l'activité plasmatique d'enzymes musculaires a permis de mettre en évidence l'existence d'un stress oxydant significatif chez le chien de sprint, dont l'importance semble minimisée par l'entrainement. Ces éléments sont en faveur d'une adaptation progressive et significative des sujets à une exposition répétée aux espèces réactives de l'oxygène générées au cours d'efforts brefs et intenses.

MOTS CLES :

- CHIEN
- STRESS OXYDANT
- EFFORT
- VITESSE
- COURSE

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur GHARIB
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur THIEBAULT
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur CADORE

DATE DE SOUTENANCE : 5 décembre 2011

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Le May, 11 avenue du grand termerieu

38500 VOIRON