VETAGRO SUP

CAMPUS VETERINAIRE DE LYON

Année 2011 - Thèse n°

Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint.

THESE

Présentée à VETAGRO SUP CAMPUS VETERINAIRE DE LYON
(Vétérinaire)
et soutenue publiquement le 15 décembre 2011
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

LENZI Frédéric
Né le 29 janvier 1985
à Marseille (13)

LISTE DU CORPS ENSEIGNANT

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

NOM	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
LE-GRAND	Dominique	Maître de conférences hors cl	Pathologie du bétail
LEBLOND	Agnes	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	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 fonction 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	Jean-Jacques	Maître de conférences hors cl	Biologie fonctionnelle
VIGUIER	Eric	Professeur 1ere cl	Anatomie Chirurgie (ACSAI)
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Maître de conférences Contractuel	Pathologie morphologique et clinique
ZENNER	Lionel	Professeur 2eme cl	Santé Publique et Vétérinaire

REMERCIEMENTS

Aux membres de notre jury

A Monsieur le Professeur **GHARIB Claude**,
Pour avoir généreusement accepté de présider notre jury, en apportant un grand intérêt à notre travail.
Respectueux remerciements.

A Monsieur le Professeur **THIEBAULT Jean-Jacques**,
Pour nous avoir offert la possibilité de travailler sur un sujet passionnant qu'est le chien de traineau, en mettant sur pied toute la préparation du travail et en réalisant l'ensemble des dosages,
Pour avoir cru jusqu'au bout à la réussite de ce travail malgré les aléas.
Très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur **GENEVOIS Jean-Pierre**,
Pour avoir accepté d'apporter un regard critique sur notre travail, tout en manifestant un vif intérêt.
Chaleureux remerciements

A ma Famille,

A mes 2 parents, **mon papa adoré** : tu resteras toujours mon exemple et ton image m'accompagne dans tout ce que je fais. Te rendre fier est ma plus belle des récompenses tant ce qui brille dans ton regard laisse transparaitre ton amour, et **ma ptite maman chérie** : tu es ma confidente, l'oreille attentive qui écoute et jamais ne blâme. Grâce à toi j'ai compris ce que ça voulait dire l'Amour, tu nous le distille à chacune de tes douces petites attentions que tu nous portes. On ne sent jamais perdu quand on a l'amour d'une mère.
Vous m'avez forgé, ce que je suis aujourd'hui je vous le dois. Merci pour votre soutien moral, votre aide (financière, éh oui), et de m'avoir poussé quand ça n'allait pas.
J'espère que je serai toujours à la hauteur de votre amour.
Je vous ai au plus profond de mon cœur.

A **mon petit frère Chris**,
Le meilleur frère qu'un frère puisse espérer : tu as cru en moi plus que moi-même et souvent été le 'grand frère'. Tu as le génie des révoltés et la folie des grands génies. Je te dois beaucoup tant tu m'as poussé vers l'avant. Je regrette de n'avoir pas su te comprendre à un moment difficile de ta vie, j'ai échoué à mon rôle de grand frère. Plus jamais ça n'arrivera, je serai toujours là pour toi parce que je tiens trop à toi !
Prends bien soin de ta petite perle nommée Samantha: je sais que vous serez heureux ensemble dans ce qui approche et ça me réjouit.
Je t'aime petit frère
PS : tu sais qu'on est les 2 seuls sur Terre à connaître la solution de « Tribouboule, 3 boules, 3 couleurs… »

A **Samantha**,
Ma belle-sœur adorée, un concentré de gentillesse et de volonté. La seule qui a réellement su dompter le fauve ! Pour moi tu fais partie de ma famille depuis très longtemps.
Sois heureuse avec mon frère.

A mes 2 pépés regrettés :
-pépé Victor, qui nous a donné le goût de la pêche. Tu me manques au moins autant que ce que tu as pu nous gâter quand on était petits. Ton 'grand bébou' te dédie cette thèse que tu dois regarder de là-haut.
-pépé Sylvain, peu connu mais tant aimé. Je me rappellerai toujours de tes séjours à la maison, c'était à chaque fois un évènement.

A **ma mémé Simone**,
La 'forceuse' comme on t'appelait (et comme on t'appelle toujours…). La meilleure cuisinière et la plus aimante des grands-mères. Ne te fais plus de soucis pour moi, je commence à être grand…

A **ma mémé Eliane et mon parrain Michel**,
Je crois qu'il faut chercher de ce côté pour trouver d'où vient mon amour des bêtes…et aussi celui du rouge !!
Merci pour vos petites attentions et votre bonne humeur.

Aux Girard : **ma Marraine Nadine**, tu as toujours été proche de nous, un peu notre grande sœur. Tes tentatives désespérées de « comment elle s'appelle ? », « nathalie ? aurélie ? gertrude ? » et tes chasse-au-trésor démentielles sont les beaux souvenirs de mon enfance. Ma voix a un peu changé depuis ce fameux discours « ensemble nous vous disons… » mais elle te dira toujours combien tu comptes pour moi. Merci pour tout ce que tu as fait !! **Mon oncle Hervé**, mon partenaire de Rabbi Jacob. **Mes cousins Valentine, Alex, et Clara**, les plus beaux, j'aimerais passer encore plus de temps avec vous, à jouer à la wii et dans la piscine.

A **Tonton Guy et Cloclo** : ton humour décalé me ravit à chaque fois. Merci pour ces merveilleux moments passés à vos côtés, notamment cette semaine au camping avec méléwouatt, ginette, et le boulon..

Au petit-frère-André : Acabi Acaba… Si tu savais le souci qu'on s'est fait pour toi !! Allez rentre à la maison maintenant.

Aux Fasulo, **Nicole, Serge, Jéjé, John et Manon** : je me rappelle ces étés passés au camping, que du bonheur. Mes microbes, et je te poulpe !!

Aux Barca et aux Barquettes, **Annick, Patrick, Marjo et Cécé** : les descentes de ski avec Tonton ça c'était du sport !! J'espère pouvoir rester très proches des mes 2 cousines adorées.

Aux Cano, **Titoune, Mario, Cyril, Audrey, Nelly, Franck et Aurélie** : on ne se voit pas souvent, mais j'adore vous retrouver aux repas de famille. Merci de vous être toujours intéressés à mes études !

Merci à vous tous d'avoir construit cette jolie famille !!

Aux Gallucci**, Anne et Jacques** : vous m'avez toujours accueilli chez vous à bras ouvert, et je me sens bien avec vous. J'ai beaucoup de chance de vous avoir rencontré. Faudrait quand même arrêter les connivences intra-gallucciennes au Barbu, c'est pas du jeu..
Je suis complètement tombé sous le charme de votre petite fée Ariane, vous pouvez me la confier, je vous promets de prendre le plus grand soin d'elle et de la rendre la plus heureuse.

A **Ariane**, *ma chérie chérie*

Mon tendre petit ange, ton regard m'apaise et ta beauté me transporte. Peu importe les chemins détournés et compliqués qu'on a pu prendre, maintenant on est heureux ensemble. Ta gentillesse et ta douceur, ton regard et ton sourire, je ne peux plus m'en passer.

Je réalise chaque jour un peu plus à quel point tu es exceptionnelle, je te regarde avec les yeux du cœur et je te vois magnifique. Je t'ai au plus profond de mon être. Mon plus grand bonheur c'est de te voir heureuse et épanouie.

Je t'aime plus que tout, et notre histoire ne fait que commencer, parce que je ne me vois pas vieillir sans toi à mes côtés.

Merci pour tout ce que tu m'apportes mi amore !

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX **15**

LISTE DES FIGURES **17**

LISTE DES PHOTOS **20**

LISTE DES ANNEXES **20**

INDEX DES ABBREVIATIONS **21**

INTRODUCTION **23**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **25**

I. LE STRESS OXYDANT CELLULAIRE **25**

A. QU'EST-CE QU'UN STRESS ? 25
B. LE STRESS OXYDANT CELLULAIRE 25
1. Les espèces réactives dans la cellule *25*
2. Définition du Stress Oxydant *27*
C. LES PRINCIPALES EOR DANS LA CELLULE : FORMATION ET CARACTERISTIQUES 27
1. EOR radicalaires *28*
a) L'anion superoxyde O_2°- 28
b) Le radical hydroxyl HO° 29
c) L'oxyde nitrique NO° 29
d) Les radicaux peroxyl ROO° 29
2. EOR non radicalaires *30*
a) L'oxygène singulet $^1O_2$ 30
b) Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 30
c) Le peroxynitrite NO_3^- 31
d) L'acide hypochloreux HClO 31
3. Le cas des métaux de transition *31*
D. DOMMAGES MACROMOLECULAIRES OCCASIONNES PAR LES EOR 33
1. Altérations de l'ADN *33*
2. Altérations des lipides *33*
3. Altérations des protéines *34*
4. Altérations des métaux de transition fixés *34*
5. Altérations des polysaccharides *34*
E. CONSEQUENCES A L'ECHELLE DE L'ORGANISME : QUELQUES AFFECTIONS ASSOCIEES 35
F. LES DEFENSES CELLULAIRES CONTRE LE STRESS OXYDANT 36
1. Les systèmes antioxydants enzymatiques *37*
a) Superoxyde dismutase SOD 37
b) Glutathion peroxydase GPX 37
c) Catalase CAT 38
d) Systèmes enzymatiques accessoires 38
2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques liposolubles *39*
a) Vitamine E 39
b) Caroténoïdes 40
c) Coenzyme Q10 ou ubiquinol 40

3. Les systèmes antioxydants non enzymatiques hydrosolubles ... 40
a) Vitamine C ou ascorbate ... 40
b) Glutathion GSH ... 40
c) Acide urique/urate ... 41
d) Bilirubine ... 41
e) Acide α-lipoïque ... 41
f) Métaux de transition et protéines de transport ... 42
g) Flavonoïdes : antioxydants ou non antioxydants? ... 42
G. LES MARQUEURS DU STRESS OXYDANT CELLULAIRE ... 43
1. Classification des marqueurs ... 44
2. Marqueurs directs : les EOR ... 44
3. Marqueurs indirects : les produits d'oxydation ... 46
a) Marqueurs de la peroxydation lipidique ... 46
(1) Etude de la fluidité membranaire par RPE ... 46
(2) Malondialdéhyde MDA ... 47
(3) Isoprostanes ... 47
(4) Alcanes expirés ... 48
b) Marqueur d'oxydation de l'ADN: le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 8OH-dG ... 48
c) Marqueurs d'oxydation des peptides et protéines ... 48
(1) Carbonyles protéiques ... 48
(2) Modification du statut rédox : le rapport GSH/GSSG ... 48
4. Marqueurs indirects : les antioxydants ... 49
5. Une méthode d'avenir : l'OSP ou Oxidative Stress Profiling (Cutler, Plummer et al. 2005) ... 49
H. ORIGINES DU STRESS OXYDANT ... 50
1. Sites de production des EOR ... 51
a) La membrane mitochondriale ... 51
b) Le complexe xanthine déshydrogénase (xanDH) / xanthine oxydase (xanOX) ... 51
c) Les enzymes et cellules de l'inflammation ... 51
d) L'oxyde nitrique synthase NOS ... 51
e) Diverses oxydations ... 52
2. Circonstances d'apparition des EOR ... 52
a) A l'état physiologique ... 52
b) Circonstances « endogènes » d'apparition d'EOR ... 52
c) Circonstances « exogènes » d'apparition d'EOR ... 53
I. ROLES PHYSIOLOGIQUES DES EOR ... 54
J. LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS : NECESSAIRE OU DELETERE ? ... 56

II. PARTICULARITES DE L'EFFORT CHEZ LE CHIEN ... 59

A. BESOINS ENERGETIQUES DU CHIEN DE SPORT ... 59
B. LES VOIES METABOLIQUES DE L'EFFORT CHEZ LE CHIEN ... 60
1. Rappels sur les voies communes aux mammifères ... 60
2. Types d'effort chez le chien de sport ... 62
3. Métabolisme énergétique propre au chien de sport ... 63
a) En effort bref de sprint ... 63
b) En effort plus soutenu de course de traineau ... 63
c) Statut thyroïdien des chiens de sport : hypothyroïdie ou adaptation ? ... 65
4. Le muscle du chien, un organe anatomiquement et physiologiquement adapté au métabolisme de l'effort ... 66
a) Généralités sur les fibres musculaires ... 66
b) Typologie musculaire du chien ... 68
c) Comparaison avec d'autres espèces ... 69
5. Conséquences alimentaires des spécificités métaboliques chez le chien ... 70
a) Cas du chien de traineau ... 71

b) Cas du lévrier de course 71
c) Synthèse 71
C. ADAPTATIONS CARDIOVASCULAIRES ET RESPIRATOIRES CHEZ LE CHIEN DE SPORT 72
1. Adaptations pour l'effort de sprint 73
2. Adaptations pour l'effort modéré à endurant 74
a) Généralités 74
(1) Notion de VO_2max 74
(2) Les facteurs influençant la VO_2max 74
b) Cas du chien de sport : une VO_2max élevée 75
(1) Un débit cardiaque important 75
(2) Une circulation périphérique optimisée 76
(3) Une ventilation correcte 76
3. Le statut thyroïdien… 77
D. LA THERMOREGULATION CHEZ LE CHIEN A L'EFFORT 77
1. L'hyperthermie d'effort 77
2. Thermolyse par polypnée thermique 78
3. Thermolyse par des modifications circulatoires 79
4. Cas particulier du cerveau : thermolyse grâce à une adaptation de l'appareil circulatoire 80
E. LE CHIEN DE SPORT, UN EXCELLENT CANDIDAT AU STRESS OXYDANT 81
F. ETUDES DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CHIEN DE SPORT 83

CONTRIBUTION PERSONNELLE : ETUDE EXPERIMENTALE DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CHIEN DE TRAINEAU EN COURSE DE SPRINT, AU COURS D'UNE COURSE DU DEFI RHONE ALPES 2011. 85

I. PRESENTATION DU SPORT DE TRAINEAU A CHIENS EN FRANCE (FFST), (FFPTC). 85

A. HISTORIQUE EN FRANCE 85
B. TYPES D'EPREUVES 85
C. RACES DE CHIENS UTILISEES 86
D. REGLEMENT DE COURSE 89

II. ETUDE DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CHIEN DE TRAINEAU LORS D'UNE COURSE DE SPRINT DU DEFI RHONE ALPES 2011. 90

A. MATERIELS ET METHODES 90
1. Chiens de l'étude 90
2. Les conditions de course 92
3. Protocole expérimental 93
4. Dosages réalisés 96
a) Paramètres biologiques : CK, AsAT, PT 96
b) Analyse de la fluidité des lipides membranaires des érythrocytes (Motta, Letellier et al. 2009) 97
c) MDA plasmatique (Motta, Letellier et al. 2009) 98
d) Activité de la PON1(Motta, Letellier et al. 2009) 98
5. Présentation des résultats et analyses statistiques 98
B. RESULTATS 99
1. Hémolyse de certains prélèvements 99
2. Effet de l'effort de sprint 100
a) Protéines totales (PT) 100
b) Paraoxonase-1 (PON) 101
c) Fluidité membranaire des érythrocytes (inverse de Tc) 103
d) Dommages musculaires : Créatine Kinase (CK) et Aspartate Amino Transférase (AsAT) 104
(1) AsAT 104
(2) CK 105
e) Malondialdéhyde (MDA) 107

3. Effet de l'attelage *108*
4. Effet de l'âge des chiens *109*
5. Effet du sexe des chiens *110*
6. Corrélation linéaire entre les paramètres, et régression orthogonale. *111*
C. DISCUSSION 112
1. Effet de l'effort de sprint *112*
2. Effet de l'attelage *115*
3. Effet de l'âge des chiens *116*
4. Effet du sexe des chiens *116*
5. Corrélation linéaire entre CK et AsAT *117*
6. Choix des marqueurs *117*
D. REMERCIEMENTS 117

CONCLUSION 119

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 121

ANNEXES 129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Synthese des principales EOR rencontrees dans la cellule, et ainsi que leurs caracteristiques, les EOR qu'elles sont susceptibles d'engendrer, les cibles biologiques qu'elles attaquent, et leur demi-vie. 32

Tableau 2.Caracteristiques des isoformes de la Superoxyde Dismutase SOD. D'apres Powers et Jackson (2008). 37

Tableau 3. Tableau recapitulatif des principaux antioxydants et de leurs modes d'action. D'apres Powers et Jackson (2008). 43

Tableau 4. Classification des principaux marqueurs du stress oxydant. D'apres Powers et Jackson (2008). 44

Tableau 5. Resume des principales circonstances d'apparition du stress oxydant 53

Tableau 6. Comparaison chez l'homme des consequences de 2 types d'effort par rapport a un mode de vie sedentaire sur le stress oxydant. D'apres Radak et al. (2008). 55

Tableau 7. Ordres de grandeurs des apports energetiques journaliers, pour un chien de sport de 20kg. D'apres une synthese de Grandjean et al.(1991) , Pibot (1995), et Hill (1998) 59

Tableau 8. Rendement energetique des differentes voies metaboliques selon differents substrats. AGLP : acides gras libres plasmatiques. D'apres Grandjean et al. (2002) 62

Tableau 9. Preponderance des voies metaboliques impliquees dans differents sports chez le chien. D'apres Grandjean et al. (Grandjean, Moquet et al. 2002) 63

Tableau 10. Valeurs energetiques des differentes classes organiques, pour 1 gramme. 1 kcal=4,18 kJ. D'apres Horton et al. (Horton, Moran et al. 1994) 64

Tableau 11. Principales caracteristiques des 3 types de fibres musculaires. D'apres Wolter (1987) 67

Tableau 12. Caracteristiques des fibres musculaires chez le chien : on retrouve les fibres I et IIA, avec en plus les fibres IIX. Pour comparer les fibres IIX du chien et IIB des autres especes, nous avons reporte les caracteristiques des IIB. SDH : Succinate DeHydrogenase 69

Tableau 13. Proportion des 2 types de fibres musculaires dans des muscles des la locomotion chez differentes especes et pour differentes races. Fibres I : fibres lentes, a faible activite en myosine ATPase ; Fibres II : fibres rapides, a forte activite en myosine ATPase 70

Tableau 14. Composition de l'alimentation en lipides (Lip), protides (Prot), et glucides (Gluc) recommandee chez le chien de sport, pour differents efforts. A gauche : en kilocalories pour 100 kilocalories d'energie metabolisable (%EM) ; a droite : en g pour 100g de matiere seche (%MS). Donnees issues de plusieurs auteurs. 72

Tableau 15. Comparaison du poids du cœur relativement au poids du corps chez l'homme, le cheval et le chien: on s'aperçoit que le chien, en particulier le Greyhound possede le ratio le plus eleve. 73

Tableau 16. Comparaison de la frequence cardiaque au repos chez differentes races de chiens, et a l'effort. bpm : battements par minute. 73

Tableau 17. Valeurs comparees de la VO2max chez l'homme et le chien : le chien possede une VO_2max et donc un niveau de travail aerobie bien plus eleve que l'homme. 75

Tableau 18. Recapitulatif des principaux parametres cardiocirculatoires chez des Foxhound avant et apres un effort, et modifications induites par l'entrainement, d'apres Musch et al. (1985). l/min : litre de sang par minute ; bpm : battements par minute ; ml : millilitre de sang. 76

Tableau 19. Recapitulatif des principales etudes mettant en evidence un stress oxydant induit a l'exercice chez le chien, et marqueurs utilises.Evol : evolution ; 8OH-dG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ; TAS : Total antioxidant status ; AGPI: acides gras polyinsatures; AGS: acides gras monoinsatures; dROMS: derivated reactive oxygen metabolites ; BAP : biological antioxidant potential; TPAO : total plasma anti-oxidant; EOR : especes oxygenees reactives. 83

Tableau 20. Resume des donnees sur les 16 chiens de l'etude. F : femelle; M : male ; TLC: Thierry LO CASCIO; CLC: Christophe LO CASCIO; LK: Ludovic KUPEZAK; PS: Philip SANGLA. Rq: le numero 15 n'apparait pas car il s'agissait d'un chien n'ayant pas couru, preleve uniquement a T0 pour un controle biochimique. 92

Tableau 21. Performances en temps et vitesse moyenne des 4 attelages de l'etude ; distance du parcours = 8,4 km .. 93

TABLEAU 22. VALEURS DE PT AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. LA DIMINUTION DE PT N'EST PAS SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5%. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS. VU : VALEURS USUELLES. 101
TABLEAU 23. VALEURS DE L'ACTIVITE DE LA PON AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. LA DIMINUTION DE LA PON EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5%. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS..... 102
TABLEAU 24. VALEURS DE TC AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. LA DIMINUTION DE TC EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 1‰. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS. 104
TABLEAU 25. VALEURS DE L'ACTIVITE DES ASAT AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. L'AUGMENTATION DES ASAT N'EST PAS SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5%. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS. VU : VALEURS USUELLES..... 105
TABLEAU 26. VALEURS DE L'ACTIVITE DES CK AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. L'AUGMENTATION DES CK N'EST PAS SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5%. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS. VU : VALEURS USUELLES. 106
TABLEAU 27. VALEURS DE LA CONCENTRATION EN MDA AVANT (T0) ET APRES (T) UNE COURSE DE SPRINT. LES VALEURS SONT DONNEES EN MOYENNE ± ECART-TYPE, AINSI QUE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% SUR LA MOYENNE ET LA FOURCHETTE DES VALEURS. L'AUGMENTATION DE MDA EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 1%. N: NOMBRE D'OBSERVATIONS..... 108

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. TRANSFERT D'ELECTRONS LORS D'UNE REACTION REDOX ENTRE UN OXYDANT ET UN REDUCTEUR. D'APRES (LEHNINGER, NELSON ET AL. 1993). 26

FIGURE 2. TRANSFERT DE PROTONS LORS D'UNE REACTION REDOX ENTRE UN OXYDANT ET UN REDUCTEUR. D'APRES (LEHNINGER, NELSON ET AL. 1993). 26

FIGURE 3. CASCADE DE PRODUCTION DES PRINCIPALES EOR : EN ORANGE EOR NON RADICALAIRES ; EN JAUNE EOR RADICALAIRES. D'APRES FAVIER (1997). 28

FIGURE 4. OXYDATION D'UN PHOSPHOLIPIDE MEMBRANAIRE CONDUISANT SOIT A UNE REACTION EN CHAINE DE PEROXYDATION LIPIDIQUE SOIT A UN REARRANGEMENT MOLECULAIRE. AG : ACIDE GRAS ; MDA : MALONDIALDEHYDE. D'APRES POWERS ET JACKSON (2008) ET SACHDEV ET DAVIES (2008). 30

FIGURE 5. OXYDATION AU SENS LARGE DU GLUCOSE OU « GLYCOSOXYDATION », SELON LES 2 VOIES PRINCIPALES : GLYCOSYLATION NON ENZYMATIQUE DES PROTEINES EN HAUT, ET OXYDATION AU SENS STRICT DU GLUCOSE EN BAS. PFG : PRODUITS FINAUX DE GLYCOSYLATION. D'APRES HALLIWELL ET GUTTERIDGE (2007). 35

FIGURE 6. EXEMPLES D'AFFECTIONS RENCONTREES CHEZ L'HOMME CAUSEES PAR LES EOR, CLASSEES PAR ORGANE CIBLE. TIRE DE FAVIER (1997). 36

FIGURE 7. STRATEGIES DE LUTTE DES ANTIOXYDANTS CONTRE LES CAUSES ET LES CONSEQUENCES DU STRESS OXYDANT. D'APRES GRANDJEAN (2005A). 36

FIGURE 8. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE "L'EFFET ZEEMAN", C'EST-A-DIRE DE LA POLARISATION DES MOMENTS MAGNETIQUES DES ELECTRONS LORSQU'ON LEUR APPLIQUE UN CHAMP MAGNETIQUE. D'APRES DEBUYST ET AL. (1999). 45

FIGURE 9.PRINCIPE SIMPLIFIE (C'EST-A-DIRE SANS INTERACTION HYPERFINE) DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE. EN HAUT : EVOLUTION DES NIVEAUX D'ENERGIE DES ELECTRONS EN FONCTION DU CHAMP MAGNETIQUE B0 ET TRACE DE L'ENERGIE APPORTEE PAR L'ONDE ELECTROMAGNETIQUE ; AU MILIEU : SPECTRE D'ABSORPTION DU RADICAL EN FONCTION DU CHAMP MAGNETIQUE, LE PIC CORRESPOND A L'ETAT DE RESONANCE ; EN BAS : DERIVEE 1ERE DE L'ABSORPTION EN FONCTION DU CHAMP MAGNETIQUE. H = CONSTANTE DE PLANCK; V = FREQUENCE DE L'ONDE ELECTROMAGNETIQUE ; G = FACTEUR DE LANDE, CARACTERISTIQUE DE CHAQUE RADICAL; B = MAGNETON DE BOHR; B_0 = VALEUR DU CHAMP. D'APRES DEBUYST ET AL. (1999). 45

FIGURE 10.REPRESENTATION DE LA SONDE 16-NS UTILISEE POUR L'ETUDE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE EN RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE. D'APRES HALLIWELL ET GUTTERIDGE (2007). 47

FIGURE 11. EXEMPLE DE BILAN OXYDATIF CHEZ L'HOMME, PRESENTE SOUS FORME DE ROSACE. LA ZONE ORANGEE DESIGNE L'INTERVALLE DES VALEURS USUELLES. 50

FIGURE 12. EXEMPLE DE BILAN OXYDATIF CHEZ LE CHEVAL APRES UN EFFORT STANDARDISE: EN BLEU AVANT COMPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS; EN ORANGE: APRES COMPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS. L'INTERVALLE DES VALEURS USUELLES EST COMPRIS ENTRE LES 2 CERCLES CONCENTRIQUES. TIRE DE (KIRSCHVINK 2011) 50

FIGURE 13. REPRESENTATION DE LA NOTION D'HORMESE : EVOLUTION EN CLOCHE DE L'EFFET D'UN AGENT PHYSICO-CHIMIQUE EN FONCTION DE SA DOSE. D'APRES RADAK ET AL. (RADAK, CHUNG ET AL. 2008). 55

FIGURE 14. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MODIFICATION DU STATUT REDOX DE LA CELLULE MUSCULAIRE PAR LES EOR, ET LES EFFETS BIOLOGIQUES ASSOCIES EN FONCTION DE LA QUANTITE D'EOR ET DE LA QUANTITE D'ANTIOXYDANTS. D'APRES NIESS ET SIMON (2007). 56

FIGURE 15.PRODUCTION D'ATP PAR LA VOIE DE LA PHOSPHOCREATINE. D'APRES GOGNY ET SOUILEM (1995). 60

FIGURE 16. PRODUCTION D'ATP PAR LA VOIE ANAEROBIE LACTIQUE. D'APRES GRANDJEAN ET AL. (2002). 60

FIGURE 17. PRODUCTION D'ATP PAR LA VOIE AEROBIE. D'APRES GRANDJEAN ET AL. (2002) 61

FIGURE 18. CHRONOLOGIE DES DIFFERENTES VOIES METABOLIQUES ET DES DIFFERENTS CARBURANTS ENERGETIQUES IMPLIQUES A L'EFFORT, SELON LA DUREE DE L'EFFORT, CHEZ 3 ESPECES : L'HOMME, LE CHIEN ET LE CHEVAL. ATP : ADENOSINE TRIPHOSPHATE ; CP : CREATINE PHOSPHATE. D'APRES WOLTER (1987). 64

FIGURE 19. EVOLUTION AU COURS D'UN EFFORT D'INTENSITE CROISSANTE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE (VO_2) ET DE LA DEPENSE ENERGETIQUE CORRESPONDANTE (COURBES BLEUES, AXE DE GAUCHE), ET DE LA QUANTITE D'ACIDE LACTIQUE PRODUIT (AL) ET DE LA DEPENSE ENERGETIQUE CORRESPONDANTE (COURBES ORANGES, AXE DE DROITE), EN FONCTION DE LA DEPENSE

ENERGETIQUE TOTALE, CHEZ LE CHIEN (ETIQUETTE ROUGE). EN COMPARAISON AUX DONNEES DE MARGARIA ET AL. (1963) CHEZ L'HOMME : SUJET NON ENTRAINE (ETIQUETTE VERTE), ET ATHLETE OLYMPIQUE (ETIQUETTE VIOLETTE). ON CONSTATE QUE LA VO_2 AUGMENTE EN CONTINU CHEZ LE CHIEN ALORS QU'ELLE EST RAPIDEMENT PLAFONNEE CHEZ L'HOMME, ET QUE LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE EST FAIBLE ET AUGMENTE PEU CHEZ LE CHIEN ALORS QU'ELLE EST BRUTALE ET IMPORTANTE CHEZ L'HOMME. CAL : CALORIES. D'APRES CERRETELLI ET AL. (1964)..... 65
FIGURE 20. MECANISMES DES 3 TYPES D'HALETEMENT CHEZ LE CHIEN. D'APRES GOLDBERG ET AL. (1981). 79
FIGURE 21. MODIFICATIONS DE LA CIRCULATION SANGUINE VEINEUSE AU NIVEAU D'UNE EXTREMITE, LE MEMBRE PELVIEN, CHEZ LE CHIEN LORS DE LUTTE CONTRE LE FROID A GAUCHE (RETOUR VEINEUX PAR LES VEINES PROFONDES VT) OU DE LUTTE CONTRE LE CHAUD A DROITE (RETOUR VEINEUX PAR LA VEINE SUPERFICIELLE VS). AT : ARTERE TIBIALE ; VT : VEINES TIBIALES ; VS : VEINE SAPHENE INTERNE. TIRE DU SITE DE L'ENVT (ENVT 2009). 79
FIGURE 22. MODIFICATIONS DE LA CIRCULATION SANGUINE SOUS-CUTANEE AU NIVEAU DES 'FENETRES THERMIQUES' CHEZ LE CHIEN, LORS DE LUTTE CONTRE LE FROID A GAUCHE (REDISTRIBUTION VERS LE RESEAU CAPILLAIRE PROFOND) OU DE LUTTE CONTRE LE CHAUD A DROITE (REDISTRIBUTION VERS LE RESEAU CAPILLAIRE SUPERFICIEL). RCP : RESEAU CAPILLAIRE PROFOND ; RCS : RESEAU CAPILLAIRE SUPERFICIEL. TIRE DU SITE DE L'ENVT (ENVT 2009)..... 80
FIGURE 23. IRRIGATION SPECIFIQUE DU CERVEAU CHEZ UN CARNIVORE, LE CHIEN, PERMETTANT UNE ELEVATION DE LA TEMPERATURE CENTRALE SANS ELEVATION DE LA TEMPERATURE CORPORELLE : LE SANG 'CHAUD' (EN ROUGE) DE L'ARTERE CAROTIDE EST REFROIDI PAR CONVECTION PAR LE SANG 'FROID' (EN BLEU) DE LA VEINE OPHTALMIQUE. D'APRES RUCKEBUSCH ET AL. (1991). 81
FIGURE 24. PLAN DU PLATEAU DE BEAUREGARD ET DU PARCOURS POUR LES ATTELAGES 4 CHIENS. 93
FIGURE 25. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL. LE TUBE AVEC LE 'BOUCHON VIOLET' REPRESENTE UN TUBE EDTA ; CELUI AVEC LE 'BOUCHON VERT' REPRESENTE UN TUBE A HEPARINE ; LES TUBES EPPENDORFS AVEC UN CONTENU 'ROUGE' CONTIENNENT DU SANG TOTAL ; CEUX AVEC UN CONTENU 'ROSE' CONTIENNENT DU PLASMA. 94
FIGURE 26. SCHEMATISATION DU MATERIEL UTILISE POUR LA MESURE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE PAR RPE. 97
FIGURE 27. DETERMINATION DE TC A PARTIR DU SPECTRE D'ABSORPTION DE LA SONDE 16-NS DANS UNE MEMBRANE BIOLOGIQUE. 97
FIGURE 28. PHOTO D'UN PRELEVEMENT OU IL Y A EU UNE FORTE HEMOLYSE, APRES CENTRIFUGATION : LE PLASMA EST ROUGE FONCE CAR COLORE PAR L'HEMOGLOBINE DES GLOBULES ROUGES ECLATES, ET IL Y A UN CULOT CLAIR CORRESPONDANT A UN MELANGE DE GLOBULES ROUGES INTACTS ET DE CYTOSQUELETTE ISSU DE GLOBULES ROUGES ECLATES. PHOTO DE F.LENZI..... 100
FIGURE 29. DISTRIBUTIONS DES VALEURS DE PT DE 13 CHIENS AVANT (T0) ET 16 CHIENS APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0)..... 100
FIGURE 30. DISTRIBUTIONS DES VALEURS DE PON DES 16 CHIENS AVANT (T0) ET APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0). 102
FIGURE 31. DISTRIBUTIONS DES VALEURS DE TC DES 16 CHIENS AVANT (T0) ET APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0). 103
FIGURE 32. DISTRIBUTIONS DES VALEURS D'ASAT DE 13 CHIENS AVANT (T0) ET 16 CHIENS APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0)..... 104
FIGURE 33. DISTRIBUTIONS DES VALEURS DE CK DE 13 CHIENS AVANT (T0) ET 16 CHIENS APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0)..... 106
FIGURE 34. DISTRIBUTIONS DES VALEURS DE MDA DE 8 CHIENS AVANT (T0) ET 16 CHIENS APRES (T) EFFORT, AINSI QUE LA DIFFERENCE (T-T0)..... 107
FIGURE 35. REPRESENTATION DE LA VALEUR DE PON A T0 DES 16 CHIENS EN FONCTION DE LEUR ATTELAGE, AINSI QUE LA MOYENNE DE L'ATTELAGE. LA DIFFERENCE GLOBALE EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5% (P<0,05). TLC : ATTELAGE DE THIERRY LO CASCIO ; CLC : ATTELAGE DE CHRISTOPHE LO CASCIO, LK : ATTELAGE DE LUDOVIC KUPEZAK ; PS : ATTELAGE DE PHILIP SANGLA. 108
FIGURE 36. REPRESENTATION DE LA VALEUR DES ASAT A T DES 16 CHIENS EN FONCTION DE LEUR ATTELAGE, AINSI QUE LA MOYENNE DE L'ATTELAGE. LA DIFFERENCE GLOBALE EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5% (P<0,05). TLC : ATTELAGE DE THIERRY LO CASCIO ; CLC : ATTELAGE DE CHRISTOPHE LO CASCIO, LK : ATTELAGE DE LUDOVIC KUPEZAK ; PS : ATTELAGE DE PHILIP SANGLA. 109
FIGURE 37. REPRESENTATION DE LA VALEUR DE MDA A T DES 16 CHIENS EN FONCTION DE LEUR CLASSE D'AGE, AINSI QUE LA MOYENNE DE CHAQUE CLASSE. LA DIFFERENCE GLOBALE EST SIGNIFICATIVE AU SEUIL DE 5% (P<0,05). CLASSE D'AGE : J POUR

les jeunes chiens jusqu'a 3 ans inclus ; A pour les adultes de 3 a 6 ans inclus ; V pour les plus vieux chiens de plus de 6 ans. n : nombre d'echantillons de chaque classe. 109
Figure 38. Representation de la valeur de Tc a T des 16 chiens en fonction de leur classe d'age, ainsi que la moyenne de chaque classe. La difference globale est significative au seuil de 5% (p<0,05). Classe d'age : J pour les jeunes chiens jusqu'a 3 ans inclus ; A pour les adultes de 3 a 6 ans inclus ; V pour les plus vieux chiens de plus de 6 ans. n : nombre d'echantillons de chaque classe..... 110
Figure 39. Representation de la valeur des AsAT a T0 de 13 chiens en fonction de leur sexe, ainsi que la moyenne de chaque groupe. La difference est significative au seuil de 5% (p<0,05). F : femelles ; M : males. .n : nombre d'echantillons de chaque groupe..... 111
Figure 40. Representation de la valeur des CK a T0 de 13 chiens en fonction de leur sexe, ainsi que la moyenne de chaque groupe. La difference est significative au seuil de 5% (p<0,05). F : femelles ; M : males. .n : nombre d'echantillons de chaque groupe..... 111
Figure 41. Representation des diagrammes de dispersion des variables prises 2 a 2, avant la course. AsAT : Aspartate Amino-Transferase ; CK : Creatine Kinase ; PON : Paraoxonase ; MDA : Malondialdehyde ; Tc : temps de correlation-relaxation. En rouge : diagramme evoquant une correlation lineaire. 111
Figure 42. Representation des diagrammes de dispersion des variables prises 2 a 2, apres la course. AsAT : Aspartate Amino-Transferase ; CK : Creatine Kinase ; PON : Paraoxonase ; MDA : Malondialdehyde ; Tc : temps de correlation-relaxation..... 111

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 et Photo 2. Siberian husky. Photos de F.LENZI 86
Photo 3. Groënlandais. Photo de F.LENZI..... 87
Photo 4. Attelage '4 chiens' mixte: sur la gauche de la photo: 2 Siberian Husky; sur la droite de la photo: 2 Malamute. Photo de F.LENZI..... 87
Photo 5. Attelage '8 chiens' race nordique: Siberian Husky. Photo de F.LENZI 87
Photo 6. Attelage de Siberian Husky en pleine course. Photo de F.LENZI 88
Photo 7. Attelage d'Alaskan Husky, sur la "stake-out" (la zone de repos). Photo de F.LENZI 88
Photo 8. Chien de type 'chasse' de Ludovic KUPEZAK. Photo de F.LENZI 88
Photo 9 et Photo 10. Croises Braque et Alaskan Husky de Christophe LO CASCIO. Photos de F.LENZI 89
Photo 11 et Photo 12. Greysters de Thierry LO CASCIO. Photos de F.LENZI..... 89
Photo 13. Exemple d'amenagement d'un pick-up pour le transport des chiens. Photo de F.LENZI lors du DRA 2008 . 89
Photo 14 et Photo 15. Exemples de traineaux utilises lors des courses de sprint. Le sac a l'avant du traineau permet de transporter un chien fatigue ou blesse. Photos de F.LENZI..... 90
Photo 16. Les 4 mushers participant juste avant le depart de la course. En haut a gauche: Ludovic KUPEZAK ; en haut a droite: Philip SANGLA ; en bas a gauche: Christophe LO CASCIO ; en bas a droite: Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011 90
Photo 17. Les 4 attelages '4 chiens' participant a l'etude, juste avant le depart de la course. En haut a gauche: Ludovic KUPEZAK ; en haut a droite: Philip SANGLA ; en bas a gauche: Christophe LO CASCIO ; en bas a droite: Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011 91
Photo 18. Prise de sang a la veine jugulaire par Jean-Jacques THIEBAULT, sur un des chiens de Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011..... 94
Photo 19. Materiel necessaire au traitement des prises de sang. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011 95
Photo 20. Recueil des plasmas et repartition dans 3 tubes eppendorf pour chaque chien. Photo de J-J.THIEBAULT lors du DRA 2011. 95
Photo 21 et Photo 22. Stockage au froid des differents prelevements: a gauche dans de la neige fraiche pour congelation pour les plasmas; a droite au refrigerateur pour eviter la congelation pour les 'sang total'. Photos de F.LENZI lors du DRA 2011 96
Photo 23. Identification des tubes eppendorf : 4 tubes pour le chien n°1 (C1) avant la course (T0) : paraoxonase (PON), malondialdehyde (ITE), enzymes musculaires et proteines totales (ENZ), fluidite membranaire par resonance paramagnetique electronique (RPE). Photo de F.LENZI lors du DRA 2011. 96

LISTE DES ANNEXES

Annexe I. Feuille de renseignements remplies par le musher concernant les chiens, leur alimentation et leur entrainement..... 129
Annexe II. Feuille de correspondance entre le numero du tube et le nom du chien..... 130
Annexe III. Tableau de Spearman..... 131

INDEX DES ABBREVIATIONS

$^1O_2$ oxygène singulet
8OH-dG 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
acétyl coA acétyl coenzyme A
ADN acide désoxyribo-nucléique
AGEs produits finaux de glycosylation *(Advanced glycation end-products)*
AGLP acides gras libres plasmatiques
AlAT alanine amino-transférase
AsAT aspartate amino-transférase
bpm battements par minute
Ca calcium
CaO_2 contenu artériel en O_2
CAT catalase
CK créatine kinase
Cl^- ion chlorure
Cu cuivre
CvO_2 contenu veineux en O_2
D débit ventilatoire
DRA Défi Rhône-Alpes
EDTA éthylène diamine tétra-acétique
ERON espèces réactives dérivées de l'oxygène ou de l'azote
FC fréquence cardiaque
Fe^{2+} ion ferreux
Fe^{3+} ion ferrique
FR fréquence respiratoire
GGT gamma glutamyl transpeptidase
GPX glutathion peroxydase
GSH glutathion
GSSG glutathion disulfide
H^+ proton hydrogène
H_2O eau
H_2O_2 peroxyde d'hydrogène
HClO acide hypochlorite
HO^- ion hydroxyde
HO° radical hydroxyl
K potassium
LDH lactate déshydrogénase
LDL lipoprotéines de faible densité
MAP-kinase Protéine-kinase activée par des facteurs mitogènes *(Mitogen-activated protein-kinase)*
MDA malondialdéhyde
Mn manganèse
Na sodium
NADH nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFκB Facteur nucléaire kappa B *(Nuclear factor kappa B)*
NO° oxyde nitrique
NO_2 dioxyde d'azote
NO_3^- peroxynitrite
NOS oxyde nitrique synthase
O_2 dioxygène ou oxygène
O_2°- anion superoxyde
O_3 ozone
OSP profil de stress oxydant *(oxidative stress profile)*
PAL phosphatase alcaline
PON1 paraoxonase-1
Q débit cardiaque
RH acide gras polyinsaturé
ROO° radical peroxyl
RPE résonnance paramagnétique électronique
SDH succinate déshydrogénase
SOD superoxyde dismutase
T3 triiodothyroxine
T4 tétraiodothyroxine
TAC capacité antioxydante totale *(total antioxidant capacity)*
TG triglycérides
Toc-OH α-tocophérol
TSH hormone de stimulation de la thyroïde
VES volume d'éjection systolique
VLDL lipoprotéines de faible densité *(Very low density lipoprotein)*
VO_2 consommation d'oxygène par unité de temps
VO_2max consommation maximale d'oxygène par unité de temps, ou puissance aérobie
xanDH xanthine déshydrogénase
xanOX xanthine oxydase
Zn zinc
α –PTT protéine de transfert de l' α-tocophérol

INTRODUCTION

Le caractère oxydant élevé de l'oxygène a permis le développement de la vie en milieu aérobie. Mais il également apporté certains inconvénients : des espèces dérivées de l'oxygène, très réactives, qui ont la capacité d'altérer les composants cellulaires. Ce mécanisme par lequel ces espèces oxygénées réactives endommagent la cellule a été qualifié de stress oxydant cellulaire. Présent de manière physiologique, il apparait également dans diverses circonstances pathologiques.

La première partie de notre travail consistera à présenter les différents aspects biochimiques du stress oxydant cellulaire : les molécules en jeu, les types de dommages causés, les mécanismes de protection et de réparation par la cellule, les méthodes de mise en évidence, les circonstances de survenue du stress oxydant, et enfin les rôles assurés au sein de la cellule. Au terme de cette présentation, nous verrons que l'effort physique apparait comme une circonstance très répandue et facilement reproductible d'apparition de stress oxydant.

Ainsi dans une deuxième partie nous détaillerons les particularités de l'effort physique chez le chien : des besoins énergétiques élevés et une alimentation spécifique, des adaptations cardiovasculaires, un métabolisme musculaire essentiellement oxydatif, un mécanisme de thermorégulation singulier etc. Toutes ces spécificités le placent comme un athlète bien différent de l'homme ou du cheval et en font un excellent candidat au stress oxydant.

Enfin, nous terminerons ce travail par une étude expérimentale conduite lors d'une course de sprint de chien de traineau au cours du Défi Rhône Alpes 2011, précédée par une présentation succincte du sport de traineau en France. L'objectif de notre étude était de caractériser un éventuel stress oxydant chez les chiens, survenu suite à l'effort intense de la course de sprint, à l'aide de marqueurs classiques (Créatine Kinase, Aspartate Amino Transférase) et plus spécifiques (Paraoxonase, Fluidité membranaire par résonance électronique paramagnétique, Malondialdéhyde).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le Stress Oxydant Cellulaire

La notion de stress oxydant cellulaire ou encore stress oxydatif cellulaire a été largement employée depuis la découverte dans les années 1930 des espèces radicalaires qui en sont la cause. Il nous est apparu nécessaire, avant même de décrire ces mécanismes biochimiques, de définir chacun des termes.

A. Qu'est-ce qu'un stress ?

Hans Selye est considéré comme le père spirituel de la notion de stress. Dans une expérience conduite en 1936 sur des rats exposés à des agents nocifs, il décrit sans parler de 'stress' un phénomène général d'adaptation ou de maladaptation aux conditions appliquées (Selye 1936). Ce n'est que plus tard qu'il utilisera le terme de *stress* pour décrire un état réactionnel d'un organisme soumis à un excitant ou *stressor*, l'ensemble des réactions de l'organisme étant rassemblé sous la dénomination de syndrome d'adaptation (Selye and Fortier 1949).

Plus récemment, Grandjean (2005a) a repris la définition proposée par Broom (1983): le **stress est un processus par lequel l'environnement, au sens général, surcharge les systèmes de régulation d'un organisme, et perturbe son état d'adaptation**.

Le propos de notre travail n'étant pas de détailler toutes les modifications engendrées par un stress, nous nous contenterons simplement de mentionner qu'il s'accompagne chez l'organisme concerné de modifications comportementales et biologiques, via une libération de glucocorticoïdes et de catécholamines par les glandes surrénales après mise en jeu de l'axe hypothalamo-hypophysaire ainsi que de peptides opioïdes par l'hypothalamus (Brugère 1991).

B. Le stress oxydant cellulaire

1. Les espèces réactives dans la cellule

L'oxygène est vital au bon fonctionnement cellulaire car il permet la formation d'énergie utilisable par la cellule. Pour autant il n'en reste pas moins dangereux dans la mesure où il est source de nombreuses espèces réactives dérivées de l'oxygène ou *reactive oxygen species (ROS)*. Ce sont des molécules très réactives, avec un potentiel oxydant élevé, qui ont la propriété d'attaquer et altérer les composants moléculaires de la cellule (ces aspects seront détaillés plus loin dans le § D page 33 de notre travail).

Pour comprendre cette réactivité importante, il faut se pencher sur la structure électronique de ces molécules : en effet la plupart d'entre elles sont des **radicaux libres**, à savoir qu'elles possèdent sur leur couche externe un ou plusieurs électrons non appariés (*radical*) et capable d'exister seules en tant que telle (*libre*), selon la définition Mandelker (2008). Ainsi pour devenir plus stables elles ont tendance à compléter leur couche externe, en arrachant spontanément des électrons à d'autres molécules : on retrouve bien le caractère oxydant qui consiste à prendre des électrons à une espèce réductrice qui, elle, en donne.

Remarque : les réactions rédox sont considérées comme des transferts d'électrons où l'espèce oxydante prend des électrons alors que l'espèce réductrice en donne (voir Figure 1). Il est aussi possible de considérer ces

réactions rédox comme des échanges de protons : l'espèce oxydante prend des protons, alors que l'espèce réductrice en donne. Ainsi biologiquement une oxydation correspond souvent à une déshydrogénation (voir Figure 2) (Lehninger, Nelson et al. 1993) .

D'ailleurs l'oxygène O_2 est considéré comme un radical, ou plus exactement comme un **bi-radical** puisqu'il possède 2 électrons non appariés. Cela explique son fort pouvoir oxydant.

En outre il existe également des **espèces non radicalaires** ayant tout de même une réactivité accrue, caractère oxydant, et qui peuvent donner après une réaction chimique des radicaux libres : c'est le cas du peroxyde d'hydrogène H_2O_2, de l'oxygène singulet $^1O_2$, peroxynitrite NO_3^- (Powers and Jackson 2008).

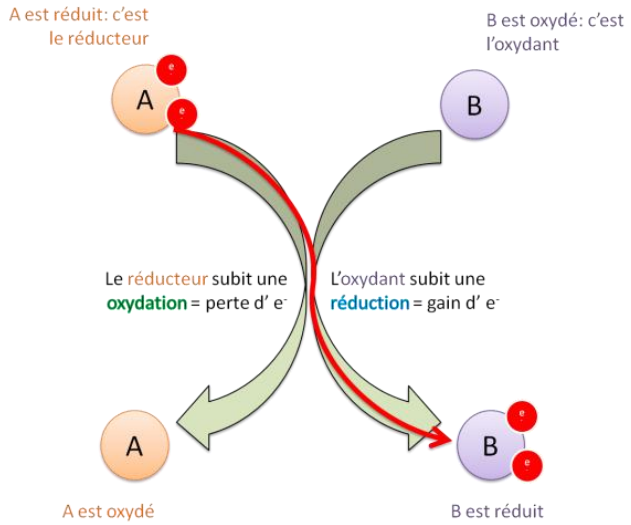


Figure 1. Transfert d'électrons lors d'une réaction rédox entre un oxydant et un réducteur. D'après (Lehninger, Nelson et al. 1993).

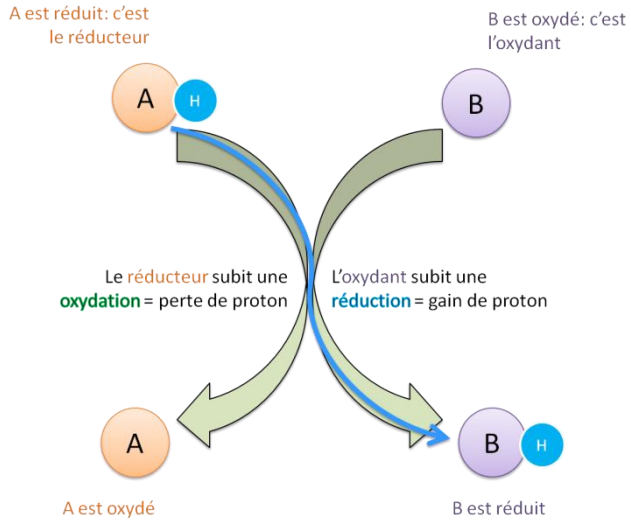


Figure 2. Transfert de protons lors d'une réaction rédox entre un oxydant et un réducteur. D'après (Lehninger, Nelson et al. 1993).

En somme, pour parler de l'ensemble des espèces très réactives qui dérivent de l'oxygène, qu'elles soient radicalaires ou non, nous reprendrons le terme très répandu dans la littérature anglo-saxonne de *reactive oxygen species* ou *ROS* (Powers and Jackson 2008), (Deaton and Marlin 2003), (McMichael 2007), c'est-à-dire **« espèces oxygénées réactives »** ou **« EOR »**.

2. Définition du Stress Oxydant

Chaque cellule utilisant l'oxygène est ainsi confrontée aux EOR, contre lesquelles elle lutte grâce à des systèmes de défenses : les antioxydants (ceux-ci seront étudiés au § F page36).

Dès lors le stress oxydant cellulaire apparaît comme une sorte de syndrome biochimique commun à toutes les cellules, correspondant à un dépassement des défenses antioxydantes par des molécules prooxydantes ((Grandjean 2005a), (Brigelius-Flohé 2009)). Il est important de préciser que cette notion ne présage en rien du caractère nocif ou bénéfique du stress oxydant cellulaire.

D'un autre côté, Jones (2006) fait remarquer que cette définition n'a d'intérêt que si l'on peut connaître dans le détail ce déséquilibre entre espèces prooxydantes vs antioxydantes. Il propose ainsi une autre définition plus axée sur l'équilibre rédox d'une cellule : le stress oxydant correspond à un déséquilibre des voies de signalisation et de contrôle du statut redox de la cellule.

En définitive, Powers (2008)reprend dans son article de synthèse les 4 aspects nécessaires à la caractérisation d'un état de stress oxydant dans la cellule:

-1) formation de molécules réactives, oxydantes

-2) dommages oxydants aux composants macromoléculaires de la cellule

-3) diminution des espèces antioxydantes

-4) déséquilibre dans le statut redox

Nous allons étudier successivement ces différents aspects.

Remarque : compte tenu de l'évolution importante des connaissances sur ce sujet d'actualité, cette définition n'est en rien figée et sera certainement modulée, modifiée dans les années à venir.

C. Les principales EOR dans la cellule : formation et caractéristiques

Toutes ces espèces réactives partagent la même propriété : elles sont relativement instables et ont de fait une durée de vie généralement très courte : leur demi-vie est de 10^{-9} à 10^{-6} sec pour les plus instables (Tessier and Marconnet 1995), jusqu'à quelques dizaines de secondes pour O_2°- et H_2O_2. Leur courte durée de vie ne devrait pas permettre aux EOR d'avoir une action majeure sur la cellule. Or cela est contrecarré par leur forte réactivité et leur capacité à produire des réactions en chaîne. En effet chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce (cf. Figure 3).

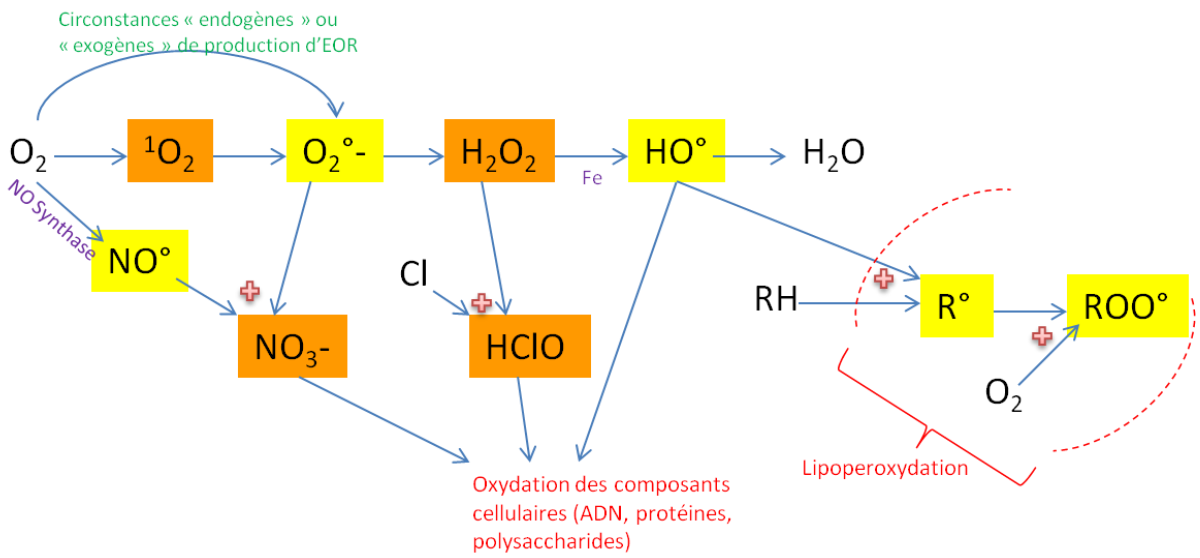


Figure 3. Cascade de production des principales EOR : en orange EOR non radicalaires ; en jaune EOR radicalaires. D'après Favier (1997).

Nous allons présenter dans ce paragraphe les principales EOR que nous pouvons retrouver dans la cellule, en distinguant les espèces radicalaires des espèces non radicalaires.

1. EOR radicalaires

a) *L'anion superoxyde O_2°-*

C'est l'une des premières EOR à être formées, par réduction d'une molécule d'O_2. Sa demi-vie longue comparée aux autres EOR est contrebalancée par le fait que les membranes biologiques lui sont relativement imperméables; il reste ainsi moyennement dangereux. Il peut conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène par la réaction suivante:

$$2\ O_2{}^{\circ}- + 2\ H^+ \overset{SOD}{=} H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(Mandelker 2008)}$$

Cette réaction peut être bénéfique comme délétère pour l'organisme :

-<u>bénéfique</u> car on passe d'une espèce très oxydante -le radical superoxyde- à une espèce moins oxydante -le peroxyde d'hydrogène ; c'est d'ailleurs l'étape catalysée par une enzyme antioxydante la Superoxyde Dismutase (SOD) que nous étudierons au § F.1.a) page37

-<u>délétère</u> car le peroxyde d'hydrogène peut être à l'origine d'autres EOR, par la réaction de Fenton (voir § suivant)

Remarque : les mécanismes de formation de O_2°- seront détaillés dans le § H page50 traitant des sources du stress oxydant.

b) *Le radical hydroxyl HO°*

Il est certainement l'EOR la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé. (Powers and Jackson 2008)

Il est à l'origine de la formation des radicaux peroxyl (voir § 2.d) ci-dessous)

c) *L'oxyde nitrique NO°*

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par une enzyme, l'oxyde nitrique synthase NOS à partir d'O_2 et d'un acide aminé, la L-arginine.

Mandelker (2008) mentionne qu'il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre EOR : le peroxynitrite NO_3^- (voir § 2.c) plus loin page31)

d) *Les radicaux peroxyl ROO°*

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'EOR, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'acides gras polyinsaturés par d'autres EOR formées préalablement.

La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction ①) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyl, et la seconde (réaction ②) à la liaison avec une molécule d'oxygène (Powers and Jackson 2008), (McMichael 2007) :

$RH + HO° = R° + H_2O$ réaction ①

puis,

$R° + O_2 = ROO°$ réaction ②

Le radical peroxyl est très instable. Pour gagner en stabilité, il peut :

-récupérer un atome d'hydrogène, notamment en « l'arrachant » à un acide gras polyinsaturé voisin. Cela conduira au redémarrage d'une nouvelle réaction similaire jusqu'au dernier acide gras polyinsaturé accessible, autrement dit à une <u>réaction en chaîne</u> (voir Figure 4):

$ROO° + RH = ROOH + R°$ (Powers and Jackson 2008)

-subir un réarrangement moléculaire à savoir l'apparition d'un cycle avec les 2 atomes d'oxygène ; le peroxyde cyclique ainsi formé pourra donner naissance, par hydrolyse ou chaleur, au <u>malondialdéhyde</u> (MDA) (Powers and Jackson 2008). Il constitue un des nombreux marqueurs du stress oxydant que nous étudierons au sein du § G.3.a)(2) page47

Powers (2008) souligne que la molécule de départ, ici notée RH, pourrait aussi bien être un acide gras monoinsaturé, voire même un acide gras saturé. Toutefois la double liaison est plus sensible à une oxydation, ce qui fait que ce sont les acides gras polyinsaturés les cibles majoritaires.

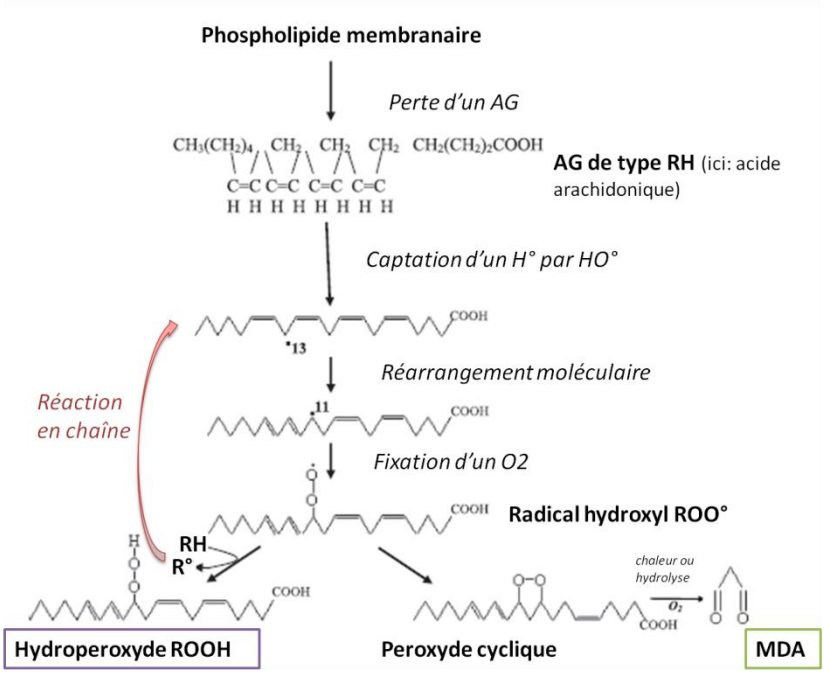


Figure 4. Oxydation d'un phospholipide membranaire conduisant soit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique soit à un réarrangement moléculaire. AG : acide gras ; MDA : malondialdéhyde. D'après Powers et Jackson (2008) et Sachdev et Davies (2008).

2. EOR non radicalaires

a) *L'oxygène singulet $^1O_2$*

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 : il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état 'excité' lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Halliwell and Gutteridge 2007).

b) *Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2*

Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyl HO° par la réaction de Fenton :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} = Fe^{3+} + HO° + HO^-$$ (Mandelker 2008)

Certains auteurs préfèrent alors considérer la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène, catalysée par un ion métallique tel que le fer ; cette réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss :

$$O_2°- + H_2O_2 \overset{Fe}{=} O_2 + HO° + HO^-$$ (Powers and Jackson 2008)

L'importance in vivo de cette réaction est encore largement débattue, dans la mesure où l'ion ferreux Fe^{2+} existe rarement à l'état libre, et souvent maintenu par le potentiel rédox de la cellule en ion ferrique Fe^{3+} (Halliwell and Gutteridge 1990)

c) *Le peroxynitrite NO_3^-*

Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux EOR produites très vite au cours du processus de stress oxydant :

$O_2°- + NO° = NO_3^-$ (Powers and Jackson 2008)

A l'instar du radical hydroxyl, NO_3^- est une EOR qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires.

d) *L'acide hypochloreux HClO*

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant.

$H_2O_2 + Cl^- = HClO + HO^-$ (Powers and Jackson 2008)

3. Le cas des métaux de transition

Les métaux de transition ne sont pas des EOR à proprement parler. Mais ils possèdent de nombreux électrons non appariés qui, après fixation sur divers ligands (formation de complexes métalliques), peuvent être transférés vers l'oxygène ou ses EOR. Ils participent ainsi à la formation de davantage d'EOR (Grandjean 2001). C'est le cas du **fer** avec la réaction de Fenton (voir § 2.b) ci-dessus).

D'autres métaux de transition comme le cuivre ou le manganèse sont aussi cités (Halliwell and Gutteridge 2007).

Pour autant il ne s'agit pas de considérer les métaux de transition comme uniquement prooxydant : en effet la plupart d'entre eux sont des cofacteurs enzymatiques importants, comme nous le verrons dans le § F page36 sur les antioxydants cellulaires.

Un récapitulatif des principales EOR et de leurs propriétés est présenté dans le Tableau 1 qui suit.

Tableau 1. Synthèse des principales EOR rencontrées dans la cellule, et ainsi que leurs caractéristiques, les EOR qu'elles sont susceptibles d'engendrer, les cibles biologiques qu'elles attaquent, et leur demi-vie.

Catégorie	Espèce (Symbole et Nom)	Caractéristiques	EOR secondaire(s) produite(s)	Cibles biologiques	Demi-vie
EOR radicalaires	O_2°- anion superoxyde	Peu dangereux en soi car peu diffusible	H_2O_2, NO_3-	Acides gras polyinsaturés	Quelques sec
	HO° radical hydroxyl	ERON la plus dangereuse	ROO°	Acides gras polyinsaturés ADN Protéines	10^{-9} sec
	NO° oxyde nitrique	Gaz donc diffuse bien Peu dangereux en soi	NO_3-		Quelques sec
	ROO° radicaux peroxyl	EOR de la « 2e vague »		Acides gras polyinsaturé voisin	10^{-1} sec
EOR non radicalaires	$^{1}O_2$ oxygène singulet	Très réactif	O_2°-		10^{-6} sec
	H_2O_2 peroxyde d'hydrogène	Antiseptique	HO°, HClO		Dizaines de secondes
	NO_3- peroxynitrite	Très agressif		Protéines	
	HClO acide hypochlorite	Diffuse bien		Protéines	
Métaux de transition	Fe, Cu, Mn fer, cuivre, manganèse	Si forme <u>libre</u> caractère radicalaire Catalysent certaines réactions de formation d'ERON ***Mais*** propriétés antioxydantes importantes si forme <u>liée</u>	HO°		

Après avoir détaillé les principales EOR que l'on rencontre dans la cellule et leurs propriétés, nous allons voir dans quelle mesure elles altèrent les composants cellulaires (point numéro 2 de la définition de Powers (2008) du Stress oxydant)

D. Dommages macromoléculaires occasionnés par les EOR

Les cibles principales sont l'ADN et les lipides membranaires, et de manière moins importante les protéines et les glucides.

1. Altérations de l'ADN

Ces attaques sont essentiellement causées par le radical hydroxyl HO°. Elles sont de différents types (Grandjean 2005a):

- modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine (celle-ci peut constituer un marqueur du Stress Oxydant, voir § G.3.b) page48) ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraine un non-appariement des bases, ou un mauvais appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN,
- destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base ou « abasique », qui s'avère être non fonctionnel,
- destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin, létale pour la cellule.
- formation de pontages avec des protéines, ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (tel que le MDA).

Ainsi nous constatons que ces dommages peuvent participer à une mutagénèse, à un arrêt des divisions cellulaires par blocage des mécanismes de réplication, à un arrêt de la synthèse protéique par blocage des mécanismes de transcription /traduction, et enfin à une mort cellulaire.

Selon McMichael (2007), les EOR pourraient même être impliquées dans l'initiation et la progression d'un cancer.

Remarque : de manière paradoxale par rapport au rôle possible dans la cancérogénèse, le radical hydroxyl est utilisé à des fins médicales en radiothérapie où c'est son action d'induction importante de mort cellulaire qui est mise à profit.

2. Altérations des lipides

Pour comprendre ces altérations, il faut se rappeler de l'action du radical hydroxyl HO° sur un acide gras responsable de la formation d'un radical peroxyl ROO°, celui-ci pouvant se stabiliser soit par des remaniements structuraux, soit en arrachant un hydrogène à un acide gras voisin. Cette dernière modalité correspond à une **réaction en chaîne de peroxydation des lipides** (se reporter au §C.1.d) page29)

Cette peroxydation touche essentiellement les acides gras polyinsaturés constitutifs des phospholipides membranaires. Elle fragilise la chaîne carbonée, qui finit par casser (Grandjean 1997). Dès lors la fluidité et la résistance membranaires sont diminuées, les échanges transmembranaires modifiés, la perméabilité au calcium augmentée, la fixation aux récepteurs altérée. Tout ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants. (McMichael 2007)

L'oxydation des lipides par les EOR peut aussi concerner des lipides circulants : elle aboutit à la formation de lipoprotéines de faible densité ou LDL oxydés, qui participent au dépôt lipidique dans les vaisseaux (plaque d'athérome) (Grandjean 2005a).

3. Altérations des protéines

Les EOR provoquent une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Grandjean 2005a). Cela concerne en particulier les enzymes cytosoliques et les protéines de transport qui perdent leurs fonctionnalités à la suite de ces modifications délétères.

4. Altérations des métaux de transition fixés

Les métaux de transition se trouvent fixés sur des protéines de transport. L'action des EOR sur leur site de fixation entraine un relargage de ces dernières : ils sont alors capables de renforcer les effets néfastes des espèces radicalaires en réagissant avec eux (échange d'électrons), comme nous l'avons vu au § C.3 page31 (Grandjean 2001)

5. Altérations des polysaccharides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (Halliwell and Gutteridge 2007):

- Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyls susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « **produits finaux de glycosylation** » ou PFG (AGEs en anglais pour « *advanced glycation end-products* ») (voir Figure 5)
- Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des EOR telles que HO° ou NO_3^- pour former des PFG (voir Figure 5).

Ces **PFG** sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d'O_2°-., et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (Grandjean 2005a).

Remarque : la glycosylation non-enzymatique des protéines est aussi appelée réaction de Maillard : ses applications sont très variées en agro-alimentaire (ex: brunissement des matières alimentaires après cuisson), santé, et cosmétique.

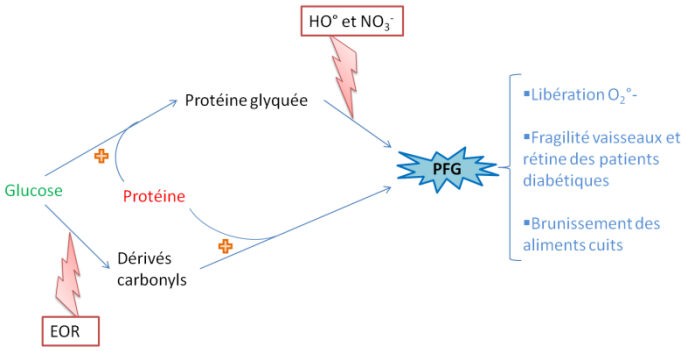


Figure 5. Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation. D'après Halliwell et Gutteridge (2007).

En définitive, il apparaît que les cibles des EOR sont nombreuses dans la mesure où l'ensemble des molécules peut être touché. Pour autant les dommages les plus néfastes pour la cellule sont la peroxydation des lipides membranaires, et les altérations de l'ADN.

E. Conséquences à l'échelle de l'organisme : quelques affections associées

La liste des affections dans lesquelles interviennent les EOR est longue (cf. Figure 6). Notre but n'est pas ici de passer en revue de manière exhaustive l'ensemble des affections, mais de donner un aperçu de cet éventail pathologique pour saisir l'importance de la caractérisation et de la compréhension du stress oxydant cellulaire.

La plus connue de ces affections est sans nul doute le vieillissement : la **théorie radicalaire** est la plus récente des théories du vieillissement, et explique ce dernier comme le résultat d'une accumulation d'altérations cellulaires oxydatives (Harman 1992).

Remarque : d'autres théories du vieillissement n'implique pas le stress oxydant : la **théorie génétique** veut que le vieillissement soit un phénomène programmé génétiquement ; la **théorie stochastique** ou « des erreurs cumulées » décrit qu'à partir d'une longévité maximale déterminée génétiquement, le vieillissement est le résultat d'une succession d'événements aléatoires (d'où théorie 'stochastique') qui altèrent l'organisation cellulaire (Grandjean 2005b).

Le stress oxydant intervient également tant chez l'homme que chez l'animal dans des maladies telles que certaines tumeurs cancéreuses, la cataracte, le diabète, l'insuffisance rénale chronique, certaines affections neurologiques dégénératives etc. (Grandjean 2005b)

Chez le chien sportif, on trouve des affections pour tout ou partie liées aux EOR comme le syndrome 'stress-diarrhée-déshydratation', la rhabdomyolyse, l'anémie du sportif, le syndrome de 'mort subite' et certains troubles comportementaux. (Grandjean 2005b)

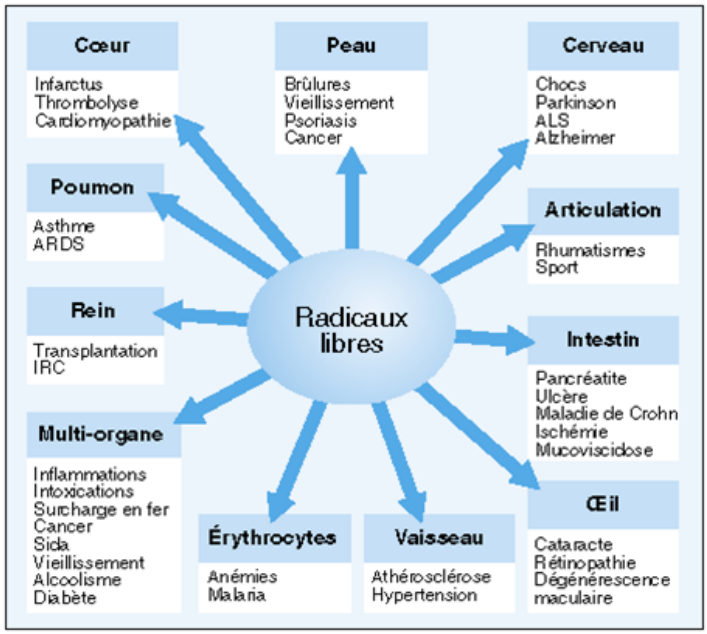
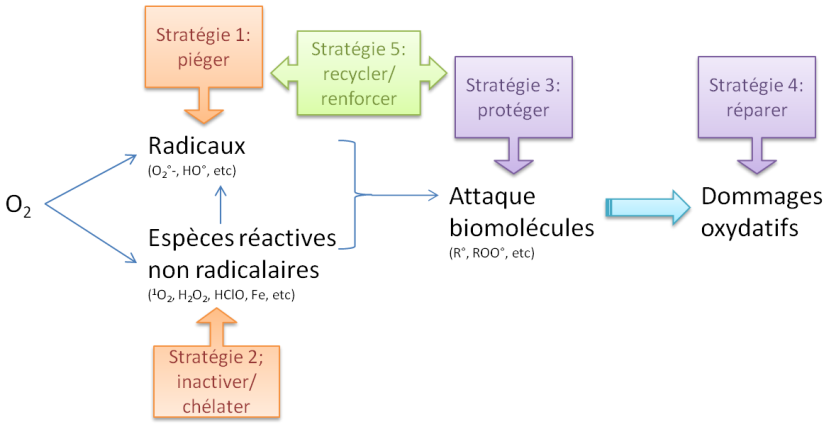


Figure 6. Exemples d'affections rencontrées chez l'homme causées par les EOR, classées par organe cible. Tiré de Favier (1997).

F. Les défenses cellulaires contre le stress oxydant

Compte tenu de la toxicité des EOR l'organisme dispose de systèmes de défense, regroupés sous le terme d'antioxydants. Un antioxydant correspond à **une substance qui peut, à faible concentration comparée aux substrats oxydables, supprimer ou empêcher l'oxydation de ceux-ci**. (Halliwell and Gutteridge 1990). Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (voir Figure 7)



Stratégies de lutte par les antioxydants contre le stress oxydant :
-1: piéger les radicaux libres: SOD, acide urique, bilirubine, vit E, vit C…
-2: inactiver les espèces réactives/ chélater les métaux: GPX+GSH, CAT, bilirubine, acide α-lipoïque, protéines de transport…
-3: protéger les biomolécules: CoQ10, vit E, caroténoïdes…
-4: réparer les dommages oxydatifs: PON1
-5: recycler ou renforcer d'autres antioxydants: CoQ10, vit C, métaux

Figure 7. Stratégies de lutte des antioxydants contre les causes et les conséquences du stress oxydant. D'après Grandjean (2005a).

On distingue classiquement 2 catégories d'antioxydants : les systèmes enzymatiques et les systèmes non-enzymatiques pour lesquels nous différencierons ceux qui sont liposolubles et donc

répartis dans les membranes biologiques de ceux qui sont hydrosolubles et donc plutôt répartis dans le cytosol, le milieu extracellulaire et le plasma

1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

a) *Superoxyde dismutase SOD*

Il s'agit de la première ligne de défense car elle accélère considérablement (multiplication de la vitesse par un facteur 1000 !) la réaction vue précédemment de transformation de l'anion superoxyde $O_2°-$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et dioxygène O_2. Elle agit en fait tel un catalyseur.

$$2\ O_2°- + 2\ H^+ \overset{SOD}{=} H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(Mandelker 2008)}$$

Il existe plusieurs isoformes de SOD chez les mammifères, qui diffèrent selon leur localisation et selon les métaux de transition présents dans leur structure et nécessaires à leur activité catalytique :

Tableau 2.Caractéristiques des isoformes de la Superoxyde Dismutase SOD. D'après Powers et Jackson (2008).

Isoforme	Cofacteurs	Localisation
SOD1 ou Cu,Zn-SOD	Cu, Zn	Cytosolique surtout, nucléaire, mitochondriale
SOD2 ou Mn-SOD	Mn	Mitochondriale
SOD3 ou Ec-SOD	Cu, Zn	Extracelluaire

On constate que l'activité de la SOD est plus grande dans les fibres musculaires de type I et IIa que dans celles de type IIb, autrement dit dans les fibres à plus fort potentiel oxydant. (Powers, Criswell et al. 1994)

b) *Glutathion peroxydase GPX*

Il s'agit d'une enzyme sélénodépendante, dont il existe là aussi plusieurs isoformes, réparties différemment dans la cellule. Elle catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH respectivement en eau et alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH. En réalité 2 molécules de GSH sont nécessaires et formeront la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfide GSSG. L'étude du GSH comme antioxydant sera reprise au § 3.b) ci-dessouspage40.

$$H_2O_2 + 2\ GSH \overset{GPX}{=} 2\ H_2O + GSSG \qquad \text{(Powers and Jackson 2008)}$$

$$ROOH + 2\ GSH \overset{GPX}{=} ROH + H_2O + GSSG \qquad \text{(Powers and Jackson 2008)}$$

De manière analogue à ce qui a été établit pour la SOD, on constate une plus grande activité de la GPX dans les fibres musculaires à fort potentiel oxydant (type I) versus celles à faible potentiel oxydant (type IIb). (Deaton and Marlin 2003)

c) *Catalase CAT*

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène H_2O_2, pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Elle fonctionne avec un cofacteur : le fer (Tessier and Marconnet 1995). Là encore des concentrations plus élevées en CAT ont été retrouvées dans les fibres musculaires oxydatives (i.e. type I). (Powers, Criswell et al. 1994)

$$2\ H_2O_2 \overset{CAT}{=} 2\ H_2O + O_2$$ (Powers and Jackson 2008)

d) *Systèmes enzymatiques accessoires*

A côté des 3 principales enzymes antioxydantes, on trouve d'autres enzymes dont le rôle est moins important (Powers and Jackson 2008) :

-Système Thioredoxine : il est constitué d'une protéine possédant un groupement thiol, la thioredoxine, et d'une enzyme, la thioredoxine réductase. La thioredoxine contribue à maintenir les protéines intracellulaires à l'état réduit. La thioredoxine réductase est une enzyme sélénodépendante. Elle catalyse la réduction de la thioredoxine oxydée, autrement dit sa régénération aux dépens d'une molécule de NADPH, et permet également de réduire les peroxydes lipidiques et de régénérer la vitamine C (dont nous verrons les propriétés antioxydantes dans le § 3.a) page40). (Arner and Holmgren 2000)

-Glutaredoxine : elle assure la protection des groupements thiols, par une réaction redox entre un NADPH et un substrat disulfide. (Berndt, Lillig et al. 2007)

-Peroxiredoxine : il s'agit d'une peroxydase, c'est-à-dire qu'elle est capable de réduire un peroxyde lipidique ROOH, ou un peroxyde nitrique NO_3^-, à partir de la thioredoxine. (Rhee, Chae et al. 2005)

-Paraoxonases : ce sont des estérases calcium-dépendantes dont le nom vient de leur capacité à détruire un métabolite toxique issu du parathion : le paraoxon. Elles constituent une des principales défenses contre la neurotoxicité des organophosphorés , dont certains sont utilisés comme armes chimiques tel que le gaz sarin (Goswami, Tayal et al. 2009).

On dénombre 3 isoformes, la principale étant la paraoxonase-1 ou PON1 (Halliwell and Gutteridge 2007). La PON1 possède aussi une activité antioxydante: la PON1 est liée aux HDL -le ''bon cholestérol ''- et protège les LDL -le ''mauvais cholestérol''- et les HDL de la peroxydation lipidique (Motta, Letellier et al. 2009).

Aviram et al. (1998) ont montré que l'activité antioxydante de PON1 et son activité estérasique impliquent des sites différents. Ils ont de plus mis en évidence que l'activité estérasique est inhibée par les lipides oxydés des LDL, et favorisée par la présence d'antioxydants tels que les flavonoïdes (Aviram, Rosenblat et al. 1999) : on peut voir dans ces constatations une sorte de « préférence » donnée à l'action antioxydante par rapport à l'action estérasique lorsque PON1 est en

présence de LDL oxydés. D'ailleurs cette inhibition du site estérasique en présence d'EOR permet d'utiliser l'activité estérasique de la PON1 comme un marqueur indirect du stress oxydant. Elle est mesurée par spectrophotométrie UV ou fluorométrie, après réaction avec du paraoxon (Motta, Letellier et al. 2009).

Enfin PON1 est protégée par le GSSG : en présence de stress oxydant, ils forment ensemble une liaison, qui est réversible à la disparition du stress oxydant (voir § 3.b) page40sur le GSH pour le détail du mécanisme).

2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques liposolubles

Etant liposolubles ils se répartissent au sein des membranes cellulaires. On trouve dans cette catégorie : la vitamine E, les caroténoïdes, et l'ubiquinol.

a) *Vitamine E*

Le terme « vitamine E » désigne en fait de nombreux isomères de tocophérols et de tocotriénols. L'isomère qui possède l'activité in vivo la plus importante chez l'animal est le **RRR-α-tocophérol.** Les teneurs plasmatiques importantes en RRR-α-tocophérol par rapport aux autres isomères sont dues à une plus grande affinité d'une protéine hépatique (la protéine de transfert de l'α-tocophérol ou α-PTT) pour la forme RRR- α-tocophérol ; cette protéine assure l'incorporation de ce dernier dans les VLDL, alors que les autres formes subissent un turn-over rapide (Halliwell and Gutteridge 2007).

L'α-tocophérol (Toc-OH) agit selon différentes modalités :

- il protège les membranes biologiques de la lipoperoxydation car il interrompt la réaction en chaîne en réagissant avec un radical peroxyl ROO° (réaction ③). Les anglo-saxons le qualifient pour cela de « chain-breaking », littéralement « briseur de chaîne ». La réaction se poursuit ensuite entre le radical d'α-tocophérol et un autre radical peroxyl ROO° pour donner un composé non radicalaire plus stable (réaction ④) (Halliwell and Gutteridge 2007)) :

  Toc-OH + ROO° = Toc-O° + ROOH réaction ③

  puis,

  Toc-O° + ROO° = ROO-O-Toc réaction ④

  Au final on s'aperçoit qu' 1 molécule d'α-tocophérol permet de piéger 2 radicaux peroxyl ROO°. En outre Watt et al. (1974) ont montré in vitro que son affinité pour les radicaux ROO° est plus grande que celle des lipides pour ces mêmes radicaux, ce qui renforce son efficacité biologique.

- il piège les radicaux superoxyde O_2°- et hydroxyde HO°, et stabilise l'oxygène singulet $^1O_2$ (Mandelker 2008).

b) *Caroténoïdes*

Ils sont majoritairement représentés par le **β-carotène**, appelé aussi « **pro-vitamine A** ». Du fait de leur faible concentration dans l'organisme, leurs rôles antioxydants sont considérés comme faibles, mais complémentaires des systèmes principaux évoqués plus haut. Le β-carotène désactive l'oxygène singulet $^1O_2$, et piège les radicaux peroxydes ROO° (Krinsky 1989).

c) *Coenzyme Q10 ou ubiquinol*

Le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaine oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation (Powers and Jackson 2008)(cf. mécanisme au § C.1.d) ci-dessuspage29). Il assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée (Ernster and Forsmark-Andree 1993).

3. Les systèmes antioxydants non enzymatiques hydrosolubles

Ces antioxydants sont répartis dans le cytosol, le plasma et le milieu extracellulaire. On y retrouve : la vitamine C, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide α-lipoïque et les flavonoïdes

a) *Vitamine C ou ascorbate*

Elle est cofacteur de nombreuses enzymes. Elle permet de piéger différentes EOR, et aussi de régénérer la vitamine E (Powers and Jackson 2008). La plupart des mammifères sont capables de synthétiser eux-mêmes l'ascorbate, sauf les primates et le cobaye chez qui elle constitue une 'vraie vitamine' (Grandjean 1997).

En présence de métaux libres (fer, cuivre), situations rares biologiquement, elle peut par contre jouer le rôle de pro-oxydant (McMichael 2007).

b) *Glutathion GSH*

Comme nous l'avons abordé lors du paragraphe sur la Glutathion peroxydase, le glutathion est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires. Deux molécules réduites de glutathion GSH sont réunies au cours de cette réaction pour donner une molécule oxydée, le glutathion disulfide GSSG :

Rappel:

$$H_2O_2 + 2\ GSH \overset{GPX}{=} 2\ H_2O + GSSG$$ (Powers and Jackson 2008)

Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers and Jackson 2008).

Par ailleurs le GSSG permet une protection des groupements thiols des protéines : il y a formation d'une liaison réversible entre le GSSG et un groupement thiol ; on parle de **« S-glutathionylation »** (Rozenberg and Aviram 2006). La PON1 (voir § 1.d) page38) peut elle-aussi être protégée par ce mécanisme. En présence d'un réducteur (le DL-dithiothreitol dans l'expérience de Rozenberg et Aviram (2006)) la liaison est rompue et la PON1 retrouve son activité. Autrement dit en

présence de stress oxydant (qui produit du GSSG au détriment du GSH), la PON1 est protégée des dommages oxydatifs par S-glutathionylation, et lors de la disparition des EOR la PON1 est restaurée :

$$\text{PON1} + \text{GSSG} \underset{\text{EOR}}{\overset{\text{Espèce réductrice}}{\leftrightarrows}} \text{PON1-SG} + \text{GSH} \qquad \text{(Rozenberg and Aviram 2006)}$$

La régénération du GSH à partir du GSSG se fait principalement grâce à l'intervention de la glutathion réductase, et elle consomme une molécule de NADPH. Le NADPH provient de la voie des pentoses phosphates pour la majorité des tissus, mais de l'isocitrate déshydrogénase dans le cas du muscle squelettique (Lawler and Demaree 2001).

Remarque : le rapport GSH/GSSG est un marqueur indirect très utilisé pour caractériser le statut redox de la cellule et l'importance du stress oxydant (voir § G.3.c)(2) page48)

c) *Acide urique/urate*

Il s'agit d'un produit issu du catabolisme des bases puriques. Comme pour tout couple acido-basique l'une ou l'autre des formes est prépondérante selon le pH du milieu : au pH physiologique la forme ionisée, l'urate, est prépondérante. Il agit comme un donneur d'électrons capable ainsi de stabiliser les radicaux hydroxyl HO°, peroxyl ROO°, et l'oxygène singulet. (Powers and Jackson 2008)

d) *Bilirubine*

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes (ex : hémoglobine). Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux peroxyl ROO° et contre le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Powers and Jackson 2008). Elle est alors transformée en biliverdine, oxydée, qui sera recyclée grâce à la biliverdine reductase aux dépends d'une molécule de NADPH (Liu, Liu et al. 2006).

Notons toutefois que Halliwell et Gutteridge (2007) mentionnent une toxicité de la bilirubine par une augmentation de la formation d'oxygène singulet en présence de lumière.

e) *Acide α-lipoïque*

L'acide α-lipoïque est un cofacteur d'un complexe enzymatique qui participe au cycle de Krebbs : le complexe α-cétoglutarate déshydrogénase. Il agit de différentes manières comme antioxydant : il piège certaines EOR telles que l'oxygène singulet $^1O_2$, le radical hydroxyl HO°, et l'acide hypochlorite HClO ; il chélate certains métaux de transition; et il participe au recyclage d'autres antioxydants- la vitamine C et/ou la vitamine E (Packer, Witt et al. 1995). Il pourrait également augmenter la concentration en glutathion en favorisant la régénération du GSSG (Packer, Witt et al. 1995).

f) *Métaux de transition et protéines de transport*

Certains métaux de transition servent de cofacteurs d'enzymes antioxydantes, et sont à ce titre regroupés au sein des antioxydants :

- **Zinc, Manganèse, Cuivre** pour la SOD ;

-Sélénium pour la GPX, la thioredoxine réductase.

Par contre certains métaux sous forme libre pourraient être responsable d'une aggravation du stress oxydant (voir § C.3 ci-dessuspage31) ; c'est le cas en particulier du *Fer* et du *Cuivre*. C'est pourquoi leurs protéines de transport, qui les chélatent, sont souvent considérées comme des antioxydants (Halliwell and Gutteridge 2007), (Grandjean 2001):

-**Transferrine** et **ferritine** pour le Fer;

-Transcupréines c'est-à-dire **céruléoplasmine** et **albumine** pour le Cuivre.

g) *Flavonoïdes : antioxydants ou non antioxydants?*

Ils font partie de la famille des polyphénols (composés à plusieurs cycles benzéniques reliés chacun à une fonction alcool -OH). Les flavonoïdes possèdent 2 cycles reliés par 3 atomes de carbone (Halliwell and Gutteridge 2007). On en trouve dans de nombreuses plantes, épices et boissons, telles que le thym, le cacao, le thé, le vin ou la bière.

In vitro les flavonoïdes possèdent une activité antioxydante certaine : ils peuvent inhiber la lipoperoxydation (notamment des LDL) et piéger des EOR telles que HO°, NO_3^-, et HClO (Halliwell and Gutteridge 2007).

In vivo leur action antioxydante n'est pas encore bien établie à cause de leur faible absorption digestive ; mais elle est fortement suspectée et a été avancée comme l'explication du fameux « paradoxe français » : cette expression vient d'une constatation faite dans la région du Sud-ouest de la France où l'on retrouve une alimentation riche en graisses et pourtant un faible taux de maladies cardiovasculaires. Cela serait dû à la consommation de vin rouge riche en flavonoïdes (Frankel, German et al. 1993a), (Sun, Simonyi et al. 2002).

L'ensemble des antioxydants présentés dans notre étude est récapitulé dans le Tableau 3 ci-après, ainsi que leur(s) mode(s) d'action(s).

Tableau 3. Tableau récapitulatif des principaux antioxydants et de leurs modes d'action. D'après Powers et Jackson (2008).

Catégorie d'antioxydants	Nom	Modes d'action principaux
Enzymatiques	SOD	Piège O_2°-
	GPX	Inactive H_2O_2 et ROOH
	CAT	Inactive H_2O_2
	PON1	Répare lipides oxydés des LDL
Non enzymatiques liposolubles	Vit E	Piège O_2°- et HO°, lutte contre lipoperoxydation (piège ROO°)
	Caroténoïdes	Inactivent $^1O_2$, piègent ROO°
	CoQ10	Lutte contre lipoperoxydation, recycle vit E
Non enzymatiques hydrosolubles	Vit C	Piège certaines ERON, recycle vit E
	GSH	Cofacteur de GPX, Protection des protéines thiols par S-glutathionylation
	Acide urique	Piège certaines ERON (donne e-)
	Bilirubine	Inactive H_2O_2, lutte contre lipoperoxydation (piège ROO°)
	Acide α-lipoïque	Piège certaines ERON, chélate métaux libres, recycle vit E et vit C
	Métaux de transition	Cofacteurs de SOD (→Cu, ZN, Mn), GPX (→Se), et CAT (→Fe)
	Protéines de transport	Chélatent les métaux de transition libres
	Flavonoïdes (?)	Luttent contre lipoperoxydation, piègent HO°, NO_3^-, et HClO

Pour résumer, nous avons pu voir la diversité des antioxydants susceptibles d'intervenir aux niveaux cellulaire et extracellulaire. Cette liste n'est pas exhaustive, et pourrait être complétée par d'autres molécules, dont le rôle est minoritaire vis-à-vis de ceux présentés ici.

La présentation des différentes EOR, de leurs dommages oxydatifs, et des défenses antioxydantes au cours des précédents paragraphes nous permet dès lors d'aborder l'étude des techniques et des marqueurs permettant de mettre en évidence le stress oxydant.

G. Les marqueurs du stress oxydant cellulaire

La mise en évidence du phénomène de stress oxydant cellulaire constitue un défi pour le scientifique dans la mesure où les EOR sont des espèces à très courte durée de vie. Le marqueur ''idéal'' serait à la fois sensible (montrer une variation à chaque période de stress oxydant), spécifique (ne pas être influencé par d'autres phénomènes comme le métabolisme, l'alimentation, le cycle cellulaire etc.), facilement détectable, stable dans le temps, et reproductible (Powers and Jackson 2008). Aucun des marqueurs ne possède toutes ces caractéristiques, c'est pourquoi les scientifiques utilisent fréquemment une combinaison de marqueurs. Nous allons présenter quelques marqueurs utilisés de nos jours.

1. Classification des marqueurs

A l'instar d'une recherche d'agent pathogène, on peut faire une première dichotomie entre les marqueurs directs, autrement dit les EOR, et les marqueurs indirects, révélant une trace de leur passage. Les marqueurs indirects sont représentés soit par les produits d'oxydation des EOR, soit par la réserve d'antioxydants de la cellule (Powers and Jackson 2008), (McMichael 2007), (Jenkins 2000). Voir Tableau 4.

Tableau 4. Classification des principaux marqueurs du stress oxydant. D'après Powers et Jackson (2008).

Marqueurs directs	Marqueurs indirects: produits d'oxydation	Marqueurs indirects: antioxydants
•Nombreuses ERON (par RPE ± spin trapping): •$O_2^{\circ-}$ •HO° •H_2O_2 •NO_{3-} •Etc	•Lipoperoxydation: Fluidité membranaire (par RPE + sonde) , MDA, Isoprostanes, Alcanes expirés. •Oxydation de l'ADN: 8OH-dG •Oxydation des protéines: carbonyles protéiques •Modification du statut rédox: rapport GSH/GSSG	•Ascorbate (vit.C) •α-Tocophérol (vit.E) •SOD, GPX, CAT •PON1 •Capacité antioxydante totale

2. Marqueurs directs : les EOR

Les méthodes permettant la mise en évidence d'EOR constituent bien entendu le *gold standard* de toutes les techniques de mise en évidence du Stress Oxydant.

La principale méthode est la **Résonance Paramagnétique Electronique** ou RPE. Elle permet de détecter les électrons non appariés d'une molécule. Sans rentrer dans le détail précis de cette technique, on peut résumer le principe de la manière suivante :

on applique un champ magnétique à une substance, afin de polariser tous les électrons c'est-à-dire d'obtenir l'orientation parallèle ou antiparallèle de leur moment magnétique par rapport à la direction du champ (c'est l'*effet Zeeman*). Voir

- Figure 8.
- on apporte ensuite une source d'énergie par l'intermédiaire d'une onde électromagnétique perpendiculaire au champ magnétique, pour permettre à ces électrons de rentrer en résonance c'est-à-dire de vibrer entre les 2 niveaux d'énergie (niveau de spin +½ et niveau de spin -½); la résonance est obtenue lorsque l'énergie apportée par l'onde correspond à la différence entre les 2 niveaux d'énergie des électrons (qui dépend de la valeur du champ). Voir Figure 9.

- on suit alors à l'aide d'un spectromètre l'absorption de l'onde par la substance ; en faisant varier la valeur du champ magnétique et en maintenant la longueur d'onde de l'onde électromagnétique constante, cette absorption varie et sera maximale pour une certaine valeur du champ. Voir Figure 9.
- on obtient alors un spectre d'absorption caractéristique de chaque radical. La courbe d'absorption est dérivée, ce qui permet de calculer certains paramètres physiques comme le temps de corrélation-relaxation. Voir Figure 9.

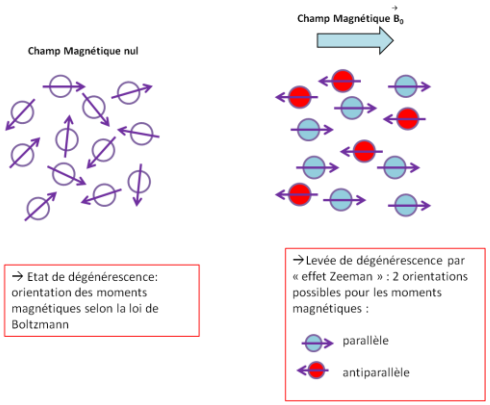


Figure 8. Représentation schématique de "l'effet Zeeman", c'est-à-dire de la polarisation des moments magnétiques des électrons lorsqu'on leur applique un champ magnétique. D'après Debuyst et al. (1999).

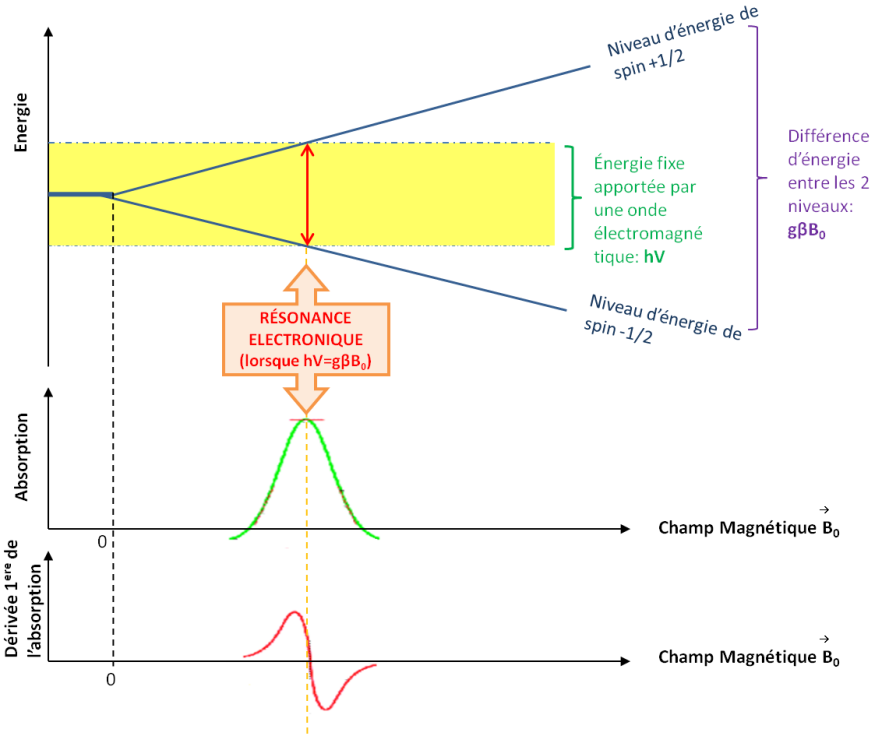


Figure 9.Principe simplifié (c'est-à-dire sans interaction hyperfine) de la Résonance Paramagnétique Electronique. En haut : évolution des niveaux d'énergie des électrons en fonction du champ magnétique B0 et tracé de l'énergie apportée par l'onde électromagnétique ; Au milieu : spectre d'absorption du radical en fonction du champ magnétique, le pic correspond à l'état de résonance ; En bas : dérivée 1ere de l'absorption en fonction du champ magnétique. h = constante de Planck; V = fréquence de l'onde électromagnétique ; g = facteur de Landé, caractéristique de chaque radical; β = magnéton de Bohr; B_0 = valeur du champ. D'après Debuyst et al. (1999).

Remarque : l'absence d'interaction hyperfine produit un spectre à 1 seule raie, mais très souvent il y a une interaction hyperfine (autrement dit un électron interagissant avec un spin nucléaire) et on obtient alors plusieurs raies.

Remarque2 : en résonance magnétique nucléaire ou RMN, le champ magnétique est fixe et on fait varier la longueur d'onde de l'onde électromagnétique.

Le problème reste que les EOR sont des espèces à durée de vie trop courte même pour cette technique. On a alors recours à des pièges de radicaux ou *spin trap* : ce sont des espèces capables de réagir avec les radicaux pour en donner d'autres mais bien plus stables. C'est le ***spin trapping*** (Halliwell and Gutteridge 2007), (Davies and Hawkins 2004).

La limite d'application de cette technique est qu'elle nécessite un appareillage spécifique et onéreux..

D'autres méthodes ont été décrites : la chromatographie liquide haute performance, la chromatographie gazeuse plus spectrométrie de masse, et la microscopie par fluorescence(Kopáni, Celec et al. 2006).

Jenkins (Jenkins 2000) souligne en outre que le terme de 'stress oxydant' correspond à des situations où les EOR ont causé des dommages aux tissus ; or la simple mise en évidence des EOR ne permet pas de juger si oui ou non ils ont causé des dommages. C'est pourquoi les scientifiques utilisent également de nombreuses techniques de mise en évidence des produits d'oxydation des EOR.

3. Marqueurs indirects : les produits d'oxydation

Ces produits peuvent résulter de l'oxydation des lipides, de l'ADN, ou des protéines.

a) *Marqueurs de la peroxydation lipidique*

(1) Etude de la fluidité membranaire par RPE

De la même manière on utilise les propriétés magnétiques des électrons non appariés. Par contre on n'utilise pas de pièges à radicaux comme dans la méthode directe, on cherche simplement à mettre en évidence des modifications des propriétés des membranes cellulaires suite au passage de ces radicaux.

Pour cela on introduit des radicaux particuliers, stables, appelés « sondes extrinsèques» dont on va suivre le comportement dans la membrane biologique. Ces sondes sont des analogues structuraux d'acides gras: acides doxyl stéariques principalement, associés à un groupement nitroxyl qui est paramagnétique.

Ex : 16-nitroxyde acide stéarique (16-NS) pour la fluidité membranaire (voir Figure 10)

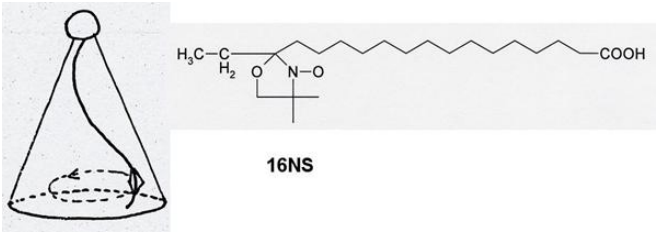


Figure 10.Représentation de la sonde 16-NS utilisée pour l'étude de la fluidité membranaire en résonance paramagnétique électronique. D'après Halliwell et Gutteridge (2007).

En effet comme nous l'avons détaillé au § C.1.b) page29, le radical hydroxyl HO° initie une réaction en chaîne de peroxydation des lipides, notamment membranaires, qui tend à diminuer la fluidité membranaire. Selon le modèle de la mosaïque fluide de la membrane et sous l'action du champ magnétique, la sonde va ''se déplacer '' dans la membrane. Si la membrane est atteinte par des EOR, sa fluidité membranaire est diminuée, et ainsi la sonde se déplacera moins vite (ou encore aura un temps de déplacement plus long) (Keddad, Thérond et al. 1996), (Valgimigli, Pedulli et al. 2001).

Là encore la limite est le coût de la technique.

(2) Malondialdéhyde MDA

Le MDA est obtenu lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (voir mécanisme de formation au § C.1.d) page29). Il constitue ainsi un marqueur tardif du phénomène de lipoperoxydation. Le MDA libre n'est pas dosable car toujours sous le seuil de détection des meilleures techniques, c'est pourquoi on dose le MDA total (libre + lié aux protéines).

Plusieurs techniques ont été décrites pour doser le MDA : réaction à l'acide thiobarbiturique (TBAR) (Halliwell and Gutteridge 2007), chromatographie liquide haute performance et chromatographie gazeuse (Halliwell and Gutteridge 2007), (Jenkins 2000), colorimétrie (Motta, Letellier et al. 2009), (Erdelmeier, Gérard-Monnier et al. 1998). Plusieurs auteurs reprochent au TBAR un manque de spécificité et un manque de sensibilité (McMichael 2007), (Halliwell and Gutteridge 2007), (Jenkins 2000).

(3) Isoprostanes

Ils résultent eux aussi d'une peroxydation d'acides gras polyinsaturés. Les isoprostanes sont des isomères de prostaglandines(Cracowski, Durand et al. 2002).

Un des avantages des isoprostanes est qu'ils sont spécifiques de l'acide gras oxydé au départ : l'isoprostane-F2 par exemple est le produit d'oxydation de l'acide arachidonique (acide gras polyinsaturé de la série ω-6); d'autres sont les produits d'oxydation de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA), 2 acides gras polyinsaturés de la série ω-3 (Halliwell and Gutteridge 2007). Ils sont de plus détectables à faible concentration. Par contre il existe malgré tout des risques d'erreurs dus à des artéfacts.

En pratique le dosage des isoprostanes peut se faire dans le sang mais aussi dans l'urine(Cracowski, Durand et al. 2002). Chez l'homme il permet par exemple d'ajuster les complémentations en antioxydants (Halliwell and Gutteridge 2007).

(4) Alcanes expirés

La peroxydation d'acides gras polyinsaturés des séries ω-3 et ω-6 peut produire, outre les isoprostanes spécifiques vus précédemment, respectivement de l'éthane et du pentane de manière volatile. Ceux-ci sont alors expirés par l'individu (Jeejeebhoy 1991).

Cette méthode de dosage présente l'avantage d'être non invasive, mais elle ne permet pas de déterminer précisément le site de peroxydation (Jenkins 2000), elle est difficilement applicable chez l'animal et présente de nombreux artéfacts. Elle reste peu utilisée.

b) *Marqueur d'oxydation de l'ADN: le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 8OH-dG*

Le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine est le reflet de l'oxydation de l'ADN. Il correspond au nucléotide dont la base d'origine, la guanine, a été hydroxylée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine (Deaton and Marlin 2003). Cette hydroxylation rend la base non fonctionnelle et nécessite une réparation. Or dans ce cas-là le processus de réparation ne se déroule pas selon le schéma classique d'excision de la base endommagée seule : il aboutit à l'excision de tout le nucléotide. C'est ainsi qu'on retrouve le 8OH-dG dans le plasma ou dans l'urine, et qu'on peut le doser par des techniques chromatographiques (Baskin, Hinchcliff et al. 2000), (Loft, Poulsen et al. 1999).

L'inconvénient est que la méthode de dosage est complexe et source de nombreux artéfacts.

c) *Marqueurs d'oxydation des peptides et protéines*

(1) Carbonyles protéiques

Les acides aminés constitutifs des protéines peuvent être oxydés et donner un groupement carbonyl (Sachdev and Davies 2008). C'est ce groupement que l'on recherche en le faisant réagir avec du 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Halliwell and Gutteridge 2007).

Cette méthode manque de spécificité.

(2) Modification du statut rédox : le rapport GSH/GSSG

Le rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG permet **de caractériser le statut redox de la cellule** et constitue aussi un bon marqueur du stress oxydant. En effet ce dernier va favoriser le GSSG au détriment du GSH, et diminuer alors le rapport (Powers and Jackson 2008), (Urso and Clarkson 2003).

Il semblerait que ce rapport manque de spécificité en raison d'une possibilité d'auto-oxydation du glutathion dans le prélèvement (Halliwell and Gutteridge 2007).

4. Marqueurs indirects : les antioxydants

L'évolution de la concentration ou de l'activité en antioxydants permet de suivre l'installation d'un stress oxydant. Il sera consommateur de réserves antioxydantes et activateur des défenses de nature enzymatique(sauf pour la PON1 qui est inhibée par le stress oxydant) (McMichael 2007). Les antioxydants que l'on peut doser sont très nombreux ; les plus couramment dosés sont l'α-tocophérol (voir page 39), l'ascorbate (voir page 40), et les enzymes SOD (voir page37), GPX (voir page 37), et CAT(voir page38), et PON1 (voir page38)

Là encore ces critères manquent de spécificité (Powers and Jackson 2008) et l'interprétation reste délicate dans la mesure où les antioxydants interagissent dans leur mode d'action.

En parallèle les scientifiques ont développé une méthode de dosage plus globale : il s'agit du Total Antioxidant Capacity ou TAC, autrement dit la capacité antioxydante totale. Le but n'est plus là de doser un seul antioxydant, mais de fournir une indication sur la protection antioxydante globale (Prior and Cao 1999), (Grandjean, Renard et al. 2005c).

Diverses techniques existent (Prior and Cao 1999), mais le principe reste le même (Urso and Clarkson 2003): on met le plasma en présence d'EOR pour mettre à l'épreuve les défenses antioxydantes et voir comment elles résistent.

Par exemple la technique TRAP -pour Total Radical trapping Antioxidant Parameter- se déroule de la manière suivante (Halliwell and Gutteridge 2007): on met en présence le plasma avec un composé particulier qui va former des radicaux peroxyls ROO° en excès; les défenses antioxydantes réagissent avec les ROO° ; une fois les défenses épuisées, les ROO° entrainent une peroxydation des lipides, que l'on sait détecter ; on mesure alors le temps qu'il a fallu pour que la lipoperoxydation se fasse. Plus il est long, plus la protection antioxydante est importante.

Les inconvénients de ces techniques globales sont d'une part qu'elles ne s'affranchissent pas des problèmes de spécificité et d'interprétation intrinsèques aux antioxydants dans le prélèvement (voir plus haut), et d'autre part qu'on ne sait plus ce qui dosé précisément.

5. Une méthode d'avenir : l'OSP ou Oxidative Stress Profiling (Cutler, Plummer et al. 2005)

Cette technique tire son originalité et son intérêt dans son caractère exhaustif. En effet le principe est de doser un maximum de marqueurs, avec plusieurs prélèvements (sérum, urine, air expiré). Tous les marqueurs utilisés sont des marqueurs indirects : on retrouve les marqueurs d'oxydation, les antioxydants, des marqueurs de l'inflammation, des marqueurs d'atteinte tissulaire (muscle par exemple).

Les perspectives de cette approche sont de raisonner sur le statut complet -ou profil- d'un individu, et d'établir un index de stress oxydant. D'ailleurs les auteurs recommandent d'intégrer d'autres profils disponibles à celui-ci, même si ils ne sont pas liés au stress oxydant, pour évaluer le statut fonctionnel complet de l'individu. Les résultats sont rendus sous forme de diagramme en étoile ou « rosace », où figurent l'ensemble des paramètres dosés ainsi que les valeurs usuelles. En France certains proposent cette approche : le laboratoire Probiox® chez l'homme dans le cadre d'un bilan oxydant (voir Figure 11) et chez le cheval, le laboratoire Franck Duncombe® chez le cheval

sportif pour le suivi de son statut oxydant (voir Figure 12). A notre connaissance aucun d'eux ne réalisent de profil oxydant chez le chien.

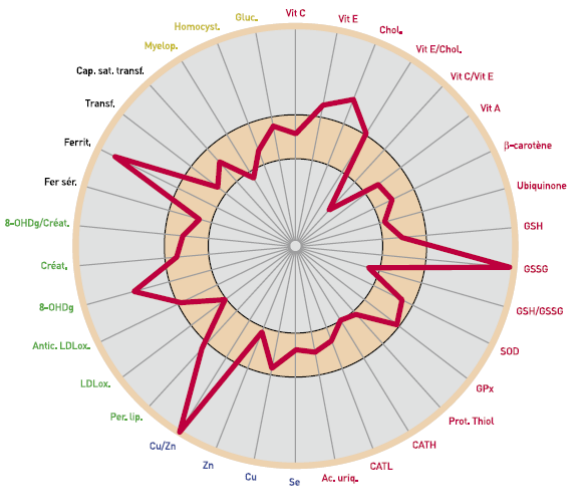


Figure 11. Exemple de bilan oxydatif chez l'homme, présenté sous forme de rosace. La zone orangée désigne l'intervalle des valeurs usuelles.

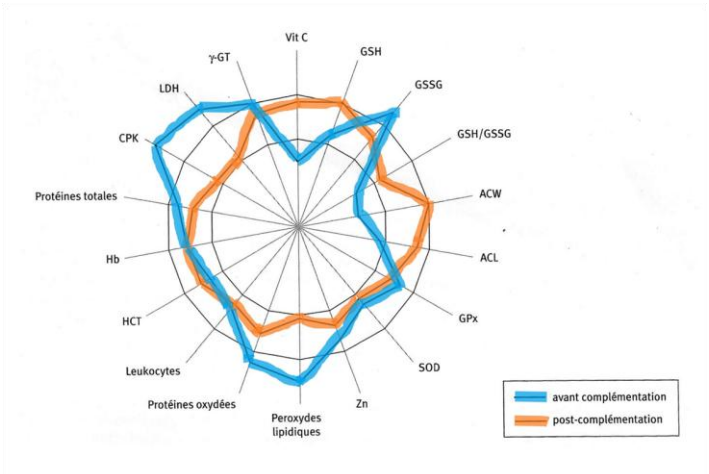


Figure 12. Exemple de bilan oxydatif chez le cheval après un effort standardisé: en bleu avant complémentation en antioxydants; en orange: après complémentation en antioxydants. L'intervalle des valeurs usuelles est compris entre les 2 cercles concentriques. Tiré de (Kirschvink 2011)

Néanmoins cette technique présente aussi des inconvénients: elle est onéreuse. Elle n'est applicable pour des études de terrain chez l'animal et reste limitée à un suivi individuel d'un sujet.

H. Origines du Stress oxydant

Nous allons nous intéresser dans cette partie à l'apparition du stress oxydant dans la cellule, en abordant successivement les sites de production des EOR puis les circonstances responsables de leur apparition.

1. Sites de production des EOR

a) *La membrane mitochondriale*

Le principal site de formation est représenté par la membrane mitochondriale dans laquelle ont lieu les différents transferts d'électrons de la chaîne respiratoire oxydative. On estime en effet que physiologiquement 1 à 3% de l'O_2 présent dans cette chaîne s'en échappe, capte un électron et aboutit à la formation d'anion superoxyde O_2°-, à l'origine des autres EOR (Tessier and Marconnet 1995), (Deaton and Marlin 2003), (Urso and Clarkson 2003), (Moller, Wallin et al. 1996).

b) *Le complexe xanthine déshydrogénase (xanDH) / xanthine oxydase (xanOX)*

Dans les conditions normales la xanDH transforme la xanthine en acide urique en donnant les électrons au $NADP^+$. En cas d'hypoxie, la xanthine est alors formée par le métabolisme anaérobie et la xanDH est convertie en xanOX. Lors de la reperfusion, il y a afflux massif d'O_2 et ainsi la xanOX transforme la xanthine en donnant des électrons à O_2, ce qui conduit à la formation d'O_2°- (Deaton and Marlin 2003).

$$\text{xanthine} + H_2O + 2\ O_2 \xrightarrow{\text{xanOX}} \text{acide urique} + O_2°- + 2\ H^+ \qquad \text{(Deaton and Marlin 2003)}$$

La xanthine est formée à partir d'hypoxanthine, au cours d'une réaction également catalysée par la xanDH et la xanOX.

Ce complexe enzymatique se situe dans les cellules endothéliales (Tessier and Marconnet 1995).

c) *Les enzymes et cellules de l'inflammation*

On trouve dans cette rubrique 2 enzymes essentielles:

- la **NAD(P)H oxydase** se situe dans toutes les cellules, au niveau de la membrane cytoplasmique. Elle libère l'anion O_2°- à l'extérieur de la cellule dans le cas des cellules phagocytaires, et à l'intérieur dans le cas des cellules non phagocytaires (Powers and Jackson 2008),
- la **myéloperoxydase** se trouve uniquement dans les polynucléaires neutrophiles. Elle génère quant à elle l'acide hypochloreux HClO, l'oxygène singulet $^1O_2$, ou le radical hydroxyl HO°. (Deaton and Marlin 2003).

d) *L'oxyde nitrique synthase NOS*

On retrouve 2 isoformes principales de cette enzyme, l'une dans les neurones et l'autre dans les cellules endothéliales (Powers and Jackson 2008). Comme son nom l'indique, elle est responsable de la formation d'oxyde nitrique NO°.

e) *Diverses oxydations*

Plusieurs auto-oxydations ont été rapportées comme sources d'EOR : il s'agit de l'auto-oxydation des catécholamines, hormones du 'stress' (Tessier and Marconnet 1995), (Deaton and Marlin 2003), (Urso and Clarkson 2003), des quinones (Tessier and Marconnet 1995), ou encore de l'oxyhémoglobine (Tessier and Marconnet 1995), (Deaton and Marlin 2003).

2. Circonstances d'apparition des EOR

a) *A l'état physiologique*

Comme nous l'avons vu dans le § 1.a) sur la membrane mitochondriale, il y a physiologiquement environ 1 à 3% du O_2 qui échappe à la chaîne respiratoire et donne des EOR. Donc il faut garder à l'esprit que même à l'état 'normal' un organisme produit des EOR.

Concernant les autres circonstances, Moller (1996) distingue deux : d'un côté celles qui sont dues à l'organisme lui-même ou « endogènes », et de l'autre celles où il y a intervention d'un élément extérieur ou « exogènes ».

b) *Circonstances « endogènes » d'apparition d'EOR*

Toute forme de stress en particulier psychologique est responsable d'une augmentation du stress oxydant (Grandjean 1997), (Moller, Wallin et al. 1996), sans doute par auto-oxydation des catécholamines (cf. § 1.e) ci-dessus).

Les phénomènes d'ischémie-reperfusion (Moller, Wallin et al. 1996) sont fréquents dans les traumatismes, et entrainent la formation d'EOR, par mise en jeu du complexe xanthine oxydoréductase (voir mécanisme au § 1.b)).

Il est également reconnu que toute inflammation participe à l'apparition d'un stress oxydant (Moller, Wallin et al. 1996), via certaines cellules de l'inflammation (voir § 1.c)).

Enfin il est bien prouvé que l'effort physique est générateur d'EOR : cela a été établit aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Powers and Jackson 2008), (Jenkins 2000), (Sachdev and Davies 2008), (Urso and Clarkson 2003), (Moller, Wallin et al. 1996), (Sacheck and Blumberg 2001). Plusieurs explications ont été avancées : la plus évidente est que l'effort entraine une **consommation accrue en O_2**,ce qui sature les systèmes de phosphorylation de la mitochondrie et donc accroit la part d'O_2 qui échappe à cette chaîne (Tessier and Marconnet 1995). D'autres explications sont également rapportées: l'**ischémie-reperfusion du muscle** via le complexe xanthine oxydoréductase (voir plus haut), l'**inflammation suite aux dommages tissulaires** dans le muscle à l'effort (voir plus haut)et même de manière surprenante en condition anaérobie à cause des **lactates produits** (Brigelius-Flohé 2009),(Sacheck and Blumberg 2001),(Kayatekin, Gonenc et al. 2002), (Groussard, Rannou-Bekono et al. 2003) . Enfin McAnulty et al. (2005) ont montré que **l'hyperthermie** présente à l'effort est aussi responsable de stress oxydant ; le mécanisme sous-jacent n'est pas connu.

c) *Circonstances « exogènes » d'apparition d'EOR*

On peut citer en premier l'alimentation : en effet il a été démontré chez l'homme et chez le chien qu'une alimentation riche en protéines, ou riche en lipides, ou très hyperglycémiante entraine plus de dommages radicalaires, alors qu'une restriction protéique ou une restriction lipidique permettent de diminuer le stress oxydant (Youngman 1993), (Walters, Hackett et al. 2010). Le mécanisme avancé par Ristow et Schmeisser (2011) est qu'un apport de lipides, de protéines ou d'un excès de glucides entrainent une augmentation du métabolisme, obligatoirement aérobie puisque seul le glucose (si il est en quantité raisonnable) peut être métabolisé par voie anaérobie, et donc une augmentation de la production d'EOR.

De même une cuisson trop importante (aliments ''brûlés'') des viandes ou poissons ou huiles favorisent la formation d'EOR. A l'inverse certains aliments sont riches en antioxydants : les agrumes sont riches en vitamine C, les céréales en vitamine E, les carottes et tomates en β-carotène, les fruits de mer et la viande en oligoéléments (fer, sélénium), ou encore le thé vert, le vin rouge et le cacao en flavonoïdes.

Remarque : une étude récente du département américain de l'Agriculture (USDA) a passé en revue la capacité antioxydante globale de 277 fruits, légumes, noix et épices: il en est ressorti que les aliments au pouvoir antioxydant in vitro le plus élevé sont les haricots rouges, suivis par les fruits rouges : myrtilles, mûres, framboises. (NutrientDataLaboratory 2010).

Les conditions d'hypoxie rencontrées en altitude sont également responsables d'une majoration du stress oxydant. Il semblerait que le mécanisme présente des similitudes avec ce qu'on retrouve pour l'ischémie-reperfusion, et qu'il y ait à la fois augmentation des EOR et baisse des défenses antioxydantes. Le stress oxydant produit est d'autant plus fort que l'altitude est élevée ou que la transition 'basse altitude-haute altitude' est rapide (Dosek, Ohno et al. 2007). Il a aussi été montré chez l'homme que l'exposition au froid accroit la production d'EOR et fait chuter les défenses antioxydantes (Martarelli, Cocchioni et al. 2011).

Enfin on trouve aussi comme facteurs exogènes les polluants atmosphériques (SO_2, NO_2, O_3), la fumée de cigarette, certains pesticides et les radiations (Moller, Wallin et al. 1996).

Les principales circonstances d'apparition du stress oxydant sont résumées dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Résumé des principales circonstances d'apparition du stress oxydant

Circonstances d'apparition des ERON
Physiologique
Toute forme de stress (psychologique en part.)
Ischémie-reperfusion
Inflammation
Effort physique intense (aérobie et anaérobie)
Alimentation déséquilibrée
Altitude Environnement froid
Polluants : atmosphériques, cigarettes, alcool, pesticides
Radiations

En résumé nous retiendrons que les EOR sont essentiellement formées dans des conditions physiologiques au niveau de la membrane mitochondriale, mais pas uniquement, et qu'elles apparaissent aussi lors d'effort physique, d'inflammation, de stress, d'une alimentation déséquilibrée, lors de contact avec des polluants.

Nous avons vu jusque là des effets délétères de la présence des EOR. Or si elles sont présentes même physiologiquement il est légitime de se demander si elles n'ont pas un ou des rôle(s) physiologique(s) pour la cellule ou l'organisme ?

I. Rôles physiologiques des EOR

Les auteurs s'accordent, pour la plupart, pour parler désormais d'effets bénéfiques des EOR. Ceux-ci ont surtout été étudiés à l'effort dans la mesure où il s'agit d'une circonstance facilement reproductible d'apparition d'EOR.

Les EOR participent à la défense de la cellule : elles sont produites et relarguées par les macrophages et les phagocytes pour lutter contre les bactéries : c'est le cas de l'anion superoxyde O_2°- (Brigelius-Flohé 2009) ; elles jouent également un rôle dans la régulation de l'apoptose, comme le peroxyde d'hydrogène (Brigelius-Flohé 2009), (Radak, Chung et al. 2008).

Enfin les EOR assurent l'activation de voies de signalisation. Plusieurs voies sont décrites : la principale et celle qui retiendra notre attention est celle qui permet la régulation de l'expression génétique d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT) et de protéines cytoprotectrices (protéines de choc thermique ou *heat shock proteins* ou encore HSP). La présence d'EOR entraine une stimulation de cette expression, via la MAP-kinase et le facteur nucléaire NFκB. Il semblerait que le mécanisme biochimique sous-jacent soit lié au statut redox : en effet à cause de leur caractère oxydant, les EOR modifie le statut redox global de la cellule, auquel sont sensibles nombre de facteurs de transcription tels que la MAP-kinase ou le NFκB. (Powers and Jackson 2008), (Mandelker 2008), (Radak, Chung et al. 2008), (Jackson 2008), (Ji 2007). Autrement dit, un exercice modéré produit des EOR, qui permettent de stimuler les défenses antioxydantes du muscle : c'est pourquoi Brigélius-Flohé (2009) décrit un stress oxydant modéré comme une « sorte de vaccination contre une attaque oxydative préjudiciable ».

Dans le cas du muscle, cette activation de voie de signalisation permet aussi la synthèse de HSP dont le rôle est d'orienter les protéines musculaires non réparables vers les protéasomes pour qu'elles y soient détruites. Cela régénère les protéines abîmées par l'effort (Sacheck and Blumberg 2001): cette protéolyse physiologique d'effort assure l'augmentation de production de force par le muscle (Brigelius-Flohé 2009), (Powers and Jackson 2008).

Remarque : à notre connaissance une seule expérience a comparé les effets d'un exercice et d'une exposition à une EOR sur l'expression des gènes : elle a mis en évidence un gène pour lequel l'expression était augmentée dans les 2 situations (McArdle, Spiers et al. 2004).

Une autre précision importante concerne l'intensité de l'effort par rapport au niveau d'entrainement de l'individu: tous les auteurs rapportent un effet bénéfique d'un exercice modéré, alors qu'un effort intense et violent entraine un stress oxydant néfaste pour la cellule et l'organisme (Brigelius-Flohé 2009), (Moller, Wallin et al. 1996), (Sacheck and Blumberg 2001), (Radak, Chung et al. 2008), (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008). Voir Tableau 6.

Tableau 6. Comparaison chez l'homme des conséquences de 2 types d'effort par rapport à un mode de vie sédentaire sur le stress oxydant. D'après Radak et al. (2008).

	Exercice intense et de courte durée	**Exercice modéré régulier**
EOR	↑	↓
Dommages oxydatifs	↑	↓
Activité des enzymes antioxydantes	↑	↑
Réparation des dommages	↑→	↑
Résistance au stress oxydant	↓	↑
Fonctions physiologiques	↓	↑

Ceci amène donc Radak, Chung et al. (2008) et Gomez-Cabrera, Domenech et al. (2008) à parler d'**hormèse** pour le stress oxydant induit à l'effort. L'hormèse est une théorie selon laquelle les systèmes biologiques répondent à la présence d'un agent physico-chimique par une courbe en cloche : à petite dose l'agent entraine une stimulation, et à forte dose une inhibition (voir Figure 13). Dans le cas présent l'agent est l'EOR.

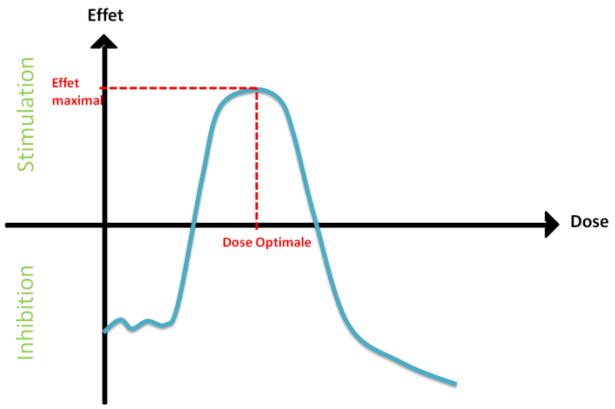


Figure 13. Représentation de la notion d'hormèse : évolution en cloche de l'effet d'un agent physico-chimique en fonction de sa dose. D'après Radak et al. (Radak, Chung et al. 2008).

En définitive nous résumerons cette partie en soulignant que les EOR **à petite dose ont des effets bénéfiques** pour la cellule (antiseptique, régénération des tissus, stimulation des défenses antioxydantes), elles permettent en quelque sorte de vacciner la cellule contre le risque que représente une attaque oxydative importante. A **forte dose, les effets peuvent être néfastes** et on se trouve alors dans une situation de stress oxydant. Voir Figure 14.

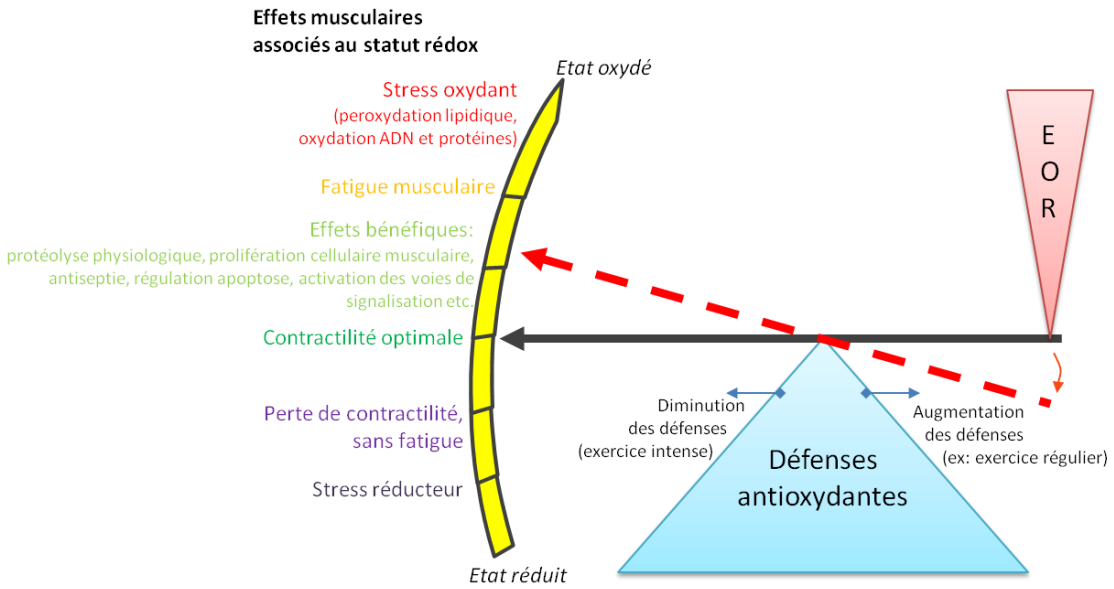


Figure 14. Représentation schématique de la modification du statut rédox de la cellule musculaire par les EOR, et les effets biologiques associés en fonction de la quantité d'EOR et de la quantité d'antioxydants. D'après Niess et Simon (2007).

Cette constatation nous amène à nous interroger sur un autre point : la supplémentation en antioxydants d'origine « exogène » (vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, et flavonoïdes). Elle paraissait évidente dans la mesure où les EOR étaient présentées comme des entités délétères pour la cellule. Or nous venons de voir qu'elles ont aussi des effets bénéfiques. Lutter contre leur présence en augmentant le pool d'antioxydants n'entraine-t-il pas une perte de ces effets ?

J. La supplémentation en antioxydants : nécessaire ou délétère ?

Le sujet est vaste et fait débat parmi les chercheurs. L'effet de cette supplémentation a toujours été étudié chez des athlètes au cours d'un exercice physique, et les antioxydants utilisés sont majoritairement la vitamine C, la vitamine E, le sélénium. Au départ on se basait sur la performance sportive pour juger d'un effet bénéfique ou d'un effet défavorable de la supplémentation. Désormais les chercheurs se focalisent sur la diminution du stress oxydant pour juger l'effet d'une telle supplémentation.

Ces expériences sont très nombreuses et dans les 2 cas nous trouvons des expériences qui mettent en évidence un effet positif de la supplémentation, et d'autres qui au contraire ne mettent

en évidence aucun effet voire même un effet négatif. Dans ces conditions, il nous est difficile de statuer sur la question.

Par contre nous pouvons présenter l'étude de quelques auteurs qui ont repris plusieurs expériences sur la supplémentation :

-**supplémentation en vitamine E seule:**

chez l'homme elle permet souvent une diminution des marqueurs du stress oxydant (pentane exhalé, MDA, CK) sans avoir d'effet pour autant sur la performance physique (Tessier and Marconnet 1995), (Urso and Clarkson 2003), (Sacheck and Blumberg 2001). Simon-Schnass et al. (1988) avaient montré un effet bénéfique de la supplémentation sur la performance en haute altitude ; mais n'oublions pas que l'hypoxie en haute altitude entraine une baisse des défenses antioxydantes c'est-à-dire place le sujet en carence relative. Sacheck et al. (2001) rapportent aussi des études chez l'homme où la supplémentation en vitamine E a été sans effet sur divers paramètres du stress oxydant. Enfin Jackson (2008) mentionne une étude in vitro chez l'homme où cette supplémentation a supprimé les effets bénéfiques d'un effort qui étaient la synthèse de HSP.

- supplémentation en vitamine C seule:

Tessier et Marconnet (1995) rapportent qu'une étude chez l'homme a montré qu'une carence en vitamine C est responsable d'une diminution de l'endurance et qu'un entrainement régulier augmentent les besoins vitaminiques ; cela laisse penser qu'il est nécessaire de complémenter l'alimentation de sujets sportifs. De même la supplémentation n'a pas augmenté les performances de militaires correctement nourris, mais elle pourrait s'avérer utile en cas de carence relative (Urso and Clarkson 2003). A l'opposé des ces résultats on trouve diverses études qui montrent un effet défavorable de la supplémentation en vitamine C : chez l'homme et le rat diminution de l'endurance et chez le Greyhound diminution de la vitesse moyenne de course (Gomez-Cabrera, Domenech et al. 2008), in vitro sur des cellules humaines suppression de l'activation des voies de signalisation par les EOR (de même que pour une supplémentation en β-carotène) (Jackson 2008).

-association de plusieurs antioxydants :

Certains avaient avancé un effet synergique des antioxydants, expliquant une meilleure réponse à une supplémentation variée par rapport à une supplémentation unique. Là encore les résultats varient. La supplémentation peut permettre une diminution des marqueurs de stress oxydant chez l'homme : CK avec vitamines E + C, MDA et pentane expiré avec vitamines E+C+β-carotène (sans influence sur la performance) (Urso and Clarkson 2003) ; pentane expiré avec vitamines E+C+rétinol+oligoéléments (sans influence sur MDA, 8OH-dG, et peroxydes lipidiques), pentane expiré et MDA avec vitamines E+C+β-carotène (Sacheck and Blumberg 2001). Chez le chien de traineau, Baskin et al. (Baskin, Hinchcliff et al. 2000) ont mis en évidence une baisse du 8OH-dG sur des courses d'endurance, et Piercy et al. (Piercy, K. et al. 2000) n'ont pas détecté de baisse significative des CK lors d'une supplémentation variée.

Gomez-Cabrera (2008) finit par conclure que cette supplémentation ne doit pas être appliquée en période d'entrainement pour ne pas supprimer les effets positifs des EOR produites par l'exercice, mais qu'elle peut l'être dans les jours précédant un effort intense type compétition pour lutter contre un stress oxydant trop fort.

En somme nous pouvons simplifier l'état des connaissances de la manière suivante :

-la supplémentation en antioxydants s'avère utile en cas de carences importantes en antioxydants, ou en période d'effort très intense (ex : compétition) ;

-elle n'est pas utile voire inutile en cas d'effort modéré (ex : entrainement), pour un sujet sain, dans la mesure où elle supprime les effets bénéfiques des EOR.

II. Particularités de l'effort chez le chien

La deuxième partie de notre travail concerne l'étude des spécificités de l'effort chez le chien versus l'homme pour lequel le stress oxydant d'effort a été largement étudié. Dans un premier temps nous allons présenter les besoins énergétiques du chien de sport. En effet cela nous permettra de comprendre les conséquences qui en découlent au niveau des voies métaboliques impliquées dans l'effort, au niveau des adaptations cardiovasculaires, et au niveau du mécanisme de thermorégulation spécifique au chien. Enfin nous établirons une synthèse des études du stress oxydant chez le chien de sport.

A. Besoins énergétiques du chien de sport

La détermination des apports énergétiques nécessaires à un chien passe par l'application d'une formule. Il existe en fait plusieurs formules, et elles tiennent compte de nombreux paramètres : poids du chien, état physiologique, race, âge etc. Si l'on considère le chien de course, il faudra rajouter au besoin **de base** un besoin lié à **l'effort de course** (le paramètre critique est la distance surtout, plus que la vitesse), et un besoin lié **au froid** dans le cas des courses de traineau (Pibot 1995).

Une synthèse de données bibliographiques sur ce sujet nous a permis de calculer un ordre de grandeur du besoin énergétique d'un chien de sport de 20kg dans différentes situations : les valeurs sont rassemblées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Ordres de grandeurs des apports énergétiques journaliers, pour un chien de sport de 20kg. D'après une synthèse de Grandjean et al.(1991) , Pibot (1995), et Hill (1998)

Situations	Apports énergétiques pour un chien de 20kg (en kcal/j)	Apports énergétiques rapportés à la masse corporelle (en kcal/kg/j)
Chien à l'entretien	1200	60
Chien à l'entretien à -20°C	2000	100
Chien de sprint type Greyhound, en course	1400-1800	70-90
Chien de traineau, moyenne distance (15km/h pendant 2h à 0°C)	2800-3300	140-165
Chien de traineau, longue distance (7km/h pendant 3j à -20°C)	7000-9500	350-475

On s'aperçoit ainsi que ce besoin chez le chien est très variable, et occupe une large fourchette de valeurs : de 1200 kcal/j à 9500 kcal/j, soit de **60 à 475 kcal/kg/j.**

Il est alors intéressant de confronter ces valeurs à celles d'un sportif humain. Après une synthèse d'un ensemble d'études, Bigard en Simler (2007) rapportent, dans le cas d'un sujet sportif de 70kg, des valeurs allant de 3100kcal/j à 6100kcal/j selon le sport considéré ; le maximum est atteint par les cyclistes du Tour de France. Si l'on rapporte ces valeurs à la masse corporelle, on trouve que les besoins énergétiques du sportif humain varient de **45 à 90 kcal/kg/j.**

Ainsi on se rend compte que les besoins énergétiques rapportés à la masse corporelle sont au moins similaires entre le sportif canin et son homologue humain, et peuvent être multipliés jusqu'à 5 chez le chien ! De manière finaliste, nous pouvons dire que cette exigence énergétique a nécessité des adaptations au niveau métabolique, que nous allons aborder dans le paragraphe suivant.

B. Les voies métaboliques de l'effort chez le chien

1. Rappels sur les voies communes aux mammifères

Chez tous les mammifères il n'y a que 3 voies de production d'énergie utilisable par la cellule musculaire à l'effort (Gogny and Souilem 1995):

- la voie de la phosphocréatine ou *voie anaérobie alactique* (car elle se déroule sans oxygène et ne produit pas d'acide lactique) : elle n'est que le « starter » de tout effort et dure moins de 10 secondes compte tenu des faibles réserves en phosphocréatine. La Figure 15 illustre la voie de la phosphocréatine.

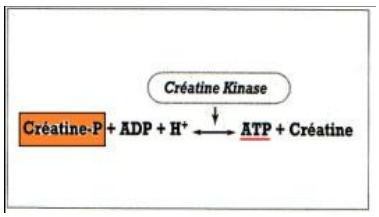


Figure 15.Production d'ATP par la voie de la phosphocréatine. D'après Gogny et Souilem (1995).

- la voie de la glycolyse ou *voie anaérobie lactique* (dans ce cas-là il y a production d'acide lactique) : elle prend le relais de la précédente ; le rendement est maximal au bout d'environ 1 minute puis il décroit significativement. Le substrat de départ est le glycogène, qui s'engage dans la glycolyse pour donner le puryvate qui s'engage à son tour dans la fermentation lactique. Cela aboutit à la formation d'un déchet, principal facteur limitant de cette voie : l'acide lactique. Son accumulation dans le muscle est délétère pour celui-ci. Un autre point faible de cette voie est son faible rendement, responsable d'une dissipation de l'énergie sous forme de chaleur et ainsi d'une augmentation de la température musculaire. Pour ces 2 raisons, l'effort produit n'excède pas 5-10 minutes. La Figure 16 représente la voie de la glycolyse.

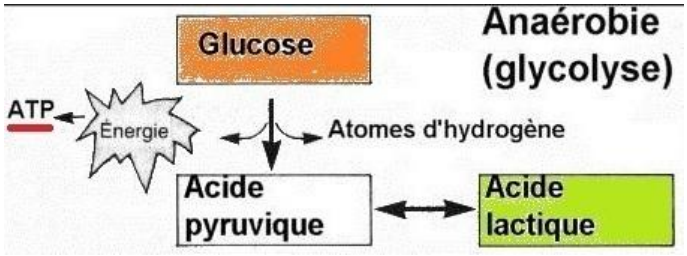


Figure 16. Production d'ATP par la voie anaérobie lactique. D'après Grandjean et al. (2002)

- la voie <u>oxydative</u> ou *voie aérobie* (car elle nécessite la présence d'oxygène en fin de chaîne) : elle ne se met en route qu'au bout de 3-4 minutes d'effort et constitue la voie d'entretien de l'effort. Le substrat de départ qui sera oxydé au cours du cycle de Krebs est l'acétyl-coenzyme A ; il peut être formé soit à partir de glycogène par glycogénolyse puis glycolyse, soit à partir d'acides gras par β-oxydation des acides gras, soit à partir d'acides aminés par néoglucogénèse puis glycolyse, soit enfin à partir de corps cétoniques par la voie inverse de la cétogénèse (Horton, Moran et al. 1994). Le facteur limitant de cette voie est l'oxygène, plus exactement le débit d'oxygène que peut recevoir le muscle pendant l'effort, dont nous reparlerons dans le § C.2 sur les adaptations cardiovasculaires. La Figure 17 présente la voie oxydative et les différents substrats possibles.

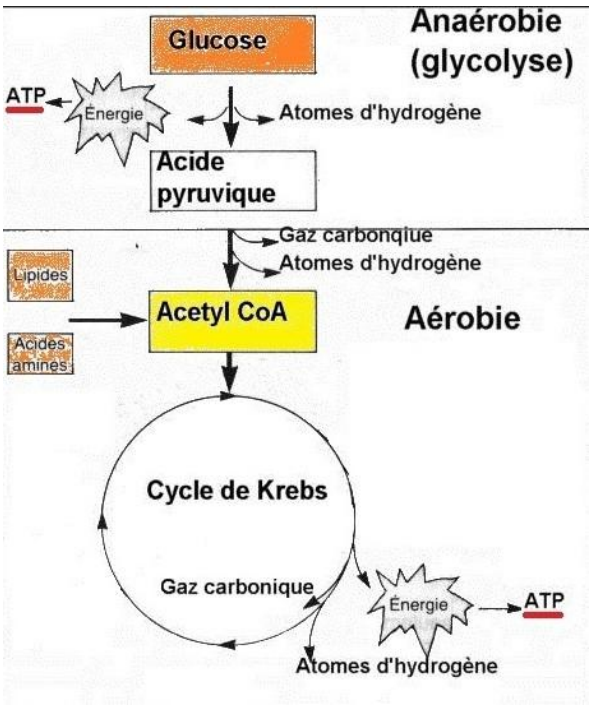


Figure 17. Production d'ATP par la voie aérobie. D'après Grandjean et al. (2002)

Notons que si l'intensité de l'effort est telle que l'organisme nécessite plus d'énergie que ne peut en fournir la voie aérobie, on tombe à nouveau dans la voie anaérobie lactique (c'est le <u>seuil aéro-anaérobie</u> (Gogny and Souilem 1995)), mais l'effort ne pourra pas être soutenu plus de 10 minutes.

Selon la voie utilisée et le substrat de départ le rendement est très variable (voir Tableau 8 ci-dessous).

Tableau 8. Rendement énergétique des différentes voies métaboliques selon différents substrats. AGLP : acides gras libres plasmatiques. D'après Grandjean et al. (2002)

Voie	Substrat	Produits	Nombre d'ATP pour 1 substrat
anaérobie alactique	Phosphocréatine	→ créatine	1
anaérobie lactique	Glycogène	→ lactate	3
	Glucose	→ lactate	2
aérobie	Glycogène	→ $CO_2 + H_2O$	37
	Glucose	→ $CO_2 + H_2O$	36
	AGLP	→ $CO_2 + H_2O$	138
	Acétoacétate	→ $CO_2 + H_2O$	23
	β hydroxybutyrate	→ $CO_2 + H_2O$	26

2. Types d'effort chez le chien de sport

Chaque effort se caractérise par le couple intensité-durée, où généralement quand l'un varie dans un sens l'autre varie en sens inverse.

Chez le chien on rencontre tous les types d'effort (Grandjean, Kronfeld et al. 1991), (Wolter 1987):

- très intense et très bref comme les épreuves de saut et d'attaque courte ; la voie sollicitée est alors celle de la phosphocréatine.
- intense et court comme les épreuves de sprint des lévriers (env. 30 secondes à 60 km/h) ; la voie majoritaire de fourniture d'énergie est alors la glycolyse.
- intense et plus long comme les courses dites 'de sprint' des chiens de traineau (env. 20 minutes à 30 km/h) ; le métabolisme est mixte avec la glycolyse et la voie oxydative.
- et enfin endurant et long comme les courses dites 'd'endurance' des chiens de traineau (plusieurs heures à 10-15 km/h) où la voie métabolique majoritaire est la voie oxydative.

La prépondérance des voies métaboliques pour différents sports chez le chien est présentée dans le Tableau 9 qui suit. :

Tableau 9. Prépondérance des voies métaboliques impliquées dans différents sports chez le chien. D'après Grandjean et al. (Grandjean, Moquet et al. 2002)

Type de sport	Anaérobiose alactique	Anaérobiose lactique	Aérobiose
Saut	+++	+	0
Attaque courte	++	++	+
Course de lévriers	+	+++++	++
Agility	0	++++	++
Ring	0	+++	+++
Field trial	0	++	+++
Décombre	+	++	++
Questage	0	++	+++
Terre-Neuve	0	+	++++
Troupeau	0	0	+++
Chasse	0	0	++++
Pistage	0	0	++++
Traîneau	0	0	+++++

Remarque : Il est fondamental de noter que dans la réalité toutes les voies participent à la fourniture d'énergie, dans des proportions différentes selon l'effort du moment, mais par souci de simplification nous préférons distinguer 2 catégories principales : l'effort de sprint du lévrier associé à la voie glycolytique, et l'effort endurant du chien de traineau associé à la voie oxydative.

3. Métabolisme énergétique propre au chien de sport

a) *En effort bref de sprint*

Dans le cas d'une course de sprint, le Greyhound utilise essentiellement la glycolyse : on remarque après effort une baisse de la glycémie et une augmentation de la lactatémie (Rose and Bloomberg 1989). Il tire le meilleur de cette voie puisqu'il est capable de tolérer une lactatémie élevée, jusqu'à 20mmol/L juste après effort, et ainsi une acidose sanguine marquée, pH sanguin entre 7,0 et 7,1 (Rose and Bloomberg 1989); les valeurs usuelles chez le chien sont respectivement 0,22-1,44mmol/L et 7,32-7,40 (Willard and Tvedten 2004).Rappelons que l'accumulation d'acide lactique est le facteur limitant de cette voie (voir § 1 ci-dessus page60).

b) *En effort plus soutenu de course de traineau*

Dans ce type d'effort le chien de traineau utilise préférentiellement les acides gras libres plasmatiques (AGLP) comme substrat pour la voie oxydative plutôt que le glycogène comme c'est le cas chez l'homme ou le cheval (Grandjean, Kronfeld et al. 1991), (Gazzola, Valette et al. 1984), (Grandjean and Mateo 1985), (Kronfeld, Hammel et al. 1977), (Hammel, Kronfeld et al. 1977). Paul et Issekutz (1967) avaient estimé que 70% du dioxygène consommé par la voie oxydative l'est pour l'oxydation des AGLP. Ainsi chez le chien l'énergie produite par l'oxydation lipidique est 2 fois plus importante que chez l'homme (McLelland, Zwingelstein et al. 1994).

Récemment, McKenzie et al. (2005) ont montré au cours d'une course marathon de traineau à chiens un phénomène métabolique propre à l'espèce canine : le glycogène musculaire au départ consommé a diminué, puis au bout d'un certain temps de course a à nouveau augmenté, dépassant même les valeurs initiales. Il a alors conclut soit que le muscle du chien avait des capacités de

synthèse du glycogène suffisamment élevées pour restituer le manque pendant les court laps de repos, soit qu'il y a eu changement ou « switch » de substrats pour épargner le glycogène musculaire.

La Figure 18 ci-dessous illustre la chronologie des différentes voies métaboliques et des différents substrats impliqués dans la fourniture d'énergie à l'effort, en fonction du type d'effort et chez 3 espèces : le chien, le cheval et l'homme.

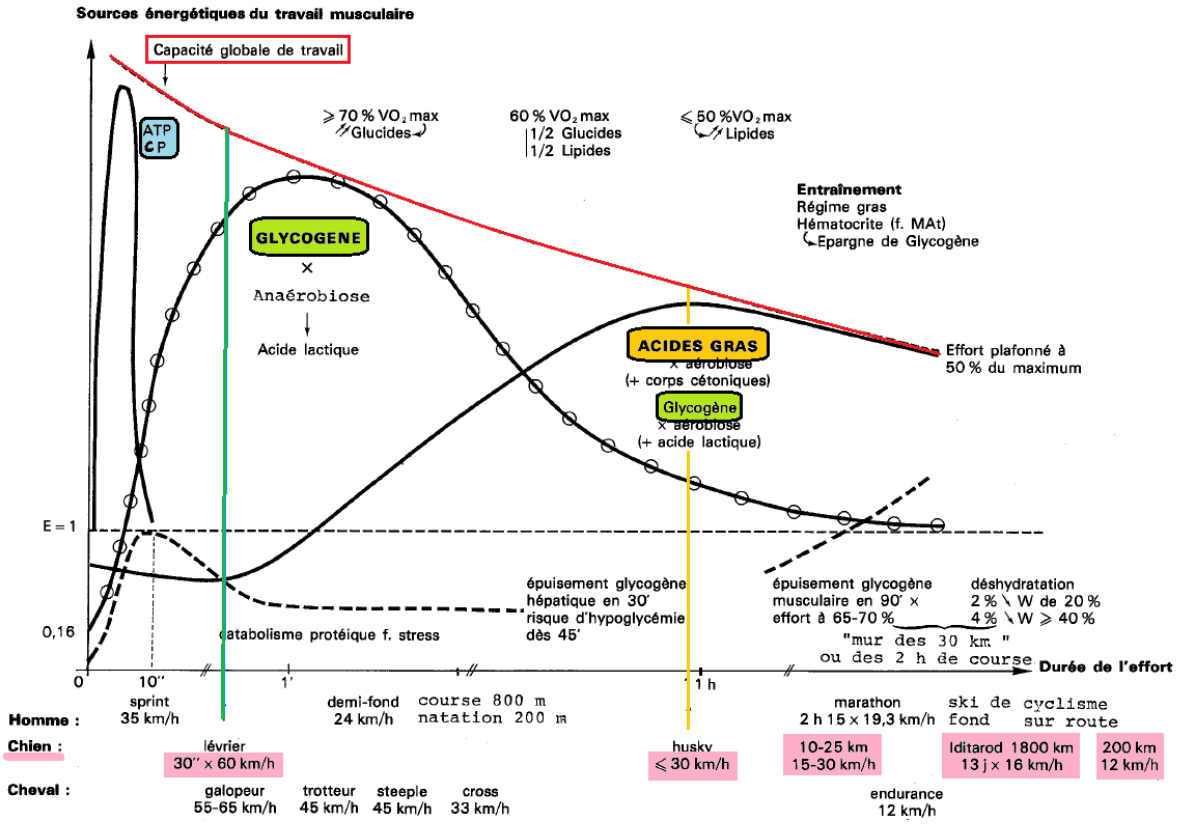


Figure 18. Chronologie des différentes voies métaboliques et des différents carburants énergétiques impliqués à l'effort, selon la durée de l'effort, chez 3 espèces : l'homme, le chien et le cheval. ATP : adénosine triphosphate ; CP : créatine phosphate. D'après Wolter (1987).

La prépondérance de l'oxydation des AGLP plutôt que du glycogène présente plusieurs avantages : le rendement est meilleur (voir Tableau 10) , elle épargne les ressources de glycogène musculaire et hépatique qui sont assez faibles et elle limite ainsi la production de déchets tels que l'acide lactique (Grandjean, Valette et al. 1993) .

Tableau 10. Valeurs énergétiques des différentes classes organiques, pour 1 gramme. 1 kcal=4,18 kJ. D'après Horton et al. (Horton, Moran et al. 1994)

Classe	Valeur énergétique pour 1 gramme En kcal	En kJ
Protéines	4	16,7
Lipides	9	37,6
Glucides	4	16,7

Cerretelli et al. (1964) ont d'ailleurs montré chez des chiens soumis à un effort d'intensité croissante sur tapis roulant, et par comparaison aux données de Margaria et al.(1963) établies chez l'homme, que la production d'acide lactique se fait de manière moins brutale chez le chien et qu'elle lui permet ainsi de prolonger son effort par rapport à l'athlète humain (voir Figure 19).

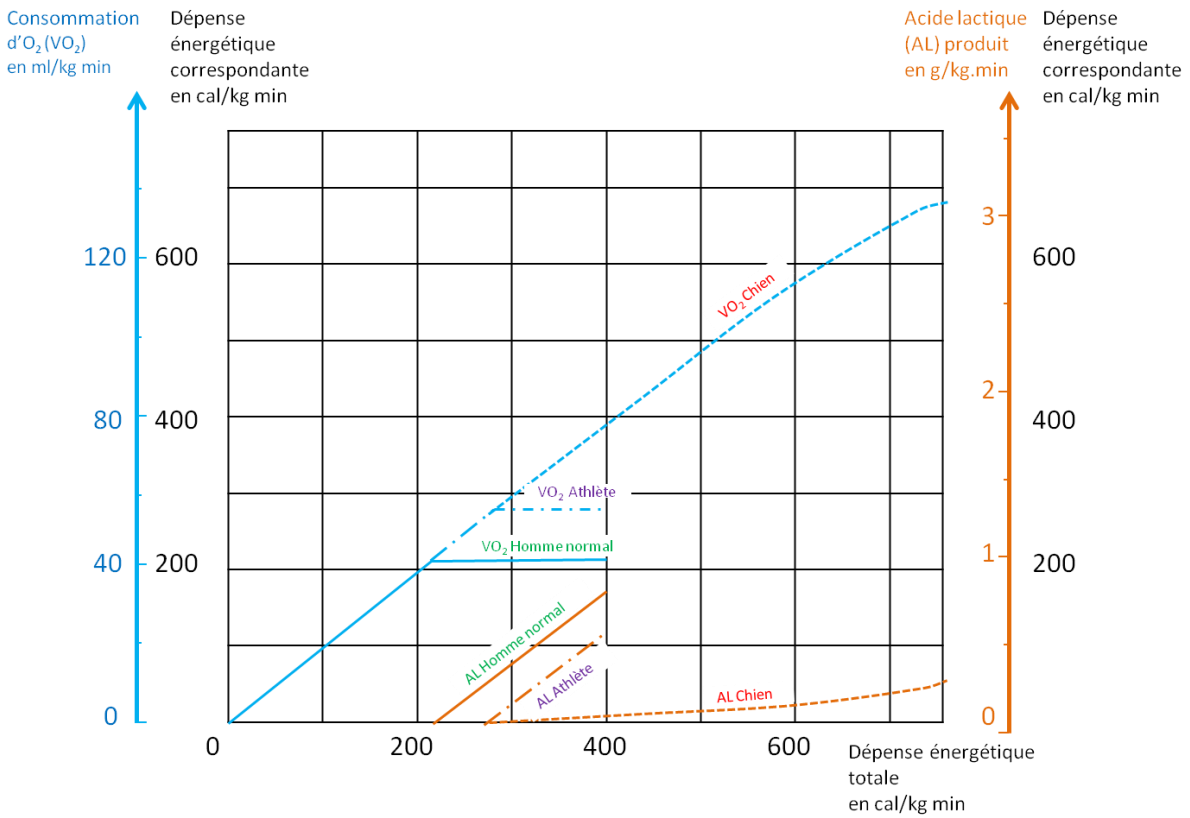


Figure 19. Evolution au cours d'un effort d'intensité croissante de la consommation d'oxygène (VO_2) et de la dépense énergétique correspondante (courbes bleues, axe de gauche), et de la quantité d'acide lactique produit (AL) et de la dépense énergétique correspondante (courbes oranges, axe de droite), en fonction de la dépense énergétique totale, chez le chien (étiquette rouge). En comparaison aux données de Margaria et al. (1963) chez l'homme : sujet non entrainé (étiquette verte), et athlète olympique (étiquette violette). On constate que la VO_2 augmente en continu chez le chien alors qu'elle est rapidement plafonnée chez l'homme, et que la production d'acide lactique est faible et augmente peu chez le chien alors qu'elle est brutale et importante chez l'homme. cal : calories. D'après Cerretelli et al. (1964).

c) *Statut thyroïdien des chiens de sport : hypothyroïdie ou adaptation ?*

Il est acquis aussi bien chez le lévrier de course (Gaughan and Bruyette 2001), (Pinilla, Shiel et al. 2009) que chez le chien de traineau (Panciera, Hinchcliff et al. 2003), (Lee, Hinchcliff et al. 2004) qu'au repos les hormones thyroïdiennes (T4 totale et/ou T4 libre et/ou T3) présentent des concentrations en dessous des valeurs usuelles. Grandjean (1995) et Bloomberg (1991) considèrent qu'il s'agit bien d'une hypothyroïdie et qu'il est nécessaire de la traiter puisqu'elle peut être responsable de fatigabilité et donc d'intolérance à l'effort, de prise de poids, d'hypercholestérolémie, de troubles de la reproduction, et d'altération du pelage. Or Pinilla et al. (2009) ont montré par scintigraphie au technétium, chez des lévriers 'suspects' d'hypothyroïdie (certains avaient une alopécie des cuisses, d'autres une T4 totale basse et d'autres enfin une baisse de performance), que ces derniers avaient des valeurs d'absorption du marqueur comprises dans les valeurs usuelles de

chiens euthyroïdiens. Ils concluent ainsi que l'hypothyroïdie est hautement improbable, et écartent également l'hypothèse selon laquelle le syndrome d'Alopécie des Cuisses chez le greyhound serait causé par une hypothyroïdie. Chez des lévriers ne présentant aucun signes classiques d'hypothyroïdie, Gaughan et Bruyette (2001) ont dosé la canine thyroid-stimulating hormone (cTSH), plus spécifique de l'hypothyroïdie, et n'ont pas mis en évidence de différence entre des lévriers et les chiens d'autres races ; cela abonde dans le sens d'une exclusion de l'hypothyroïdie.

De plus Panciera et al. (2003), Lee et al. (2004), et Evason et al. (2004) ont montré chez des chiens de traineau sans signe clinique évocateur d'une hypothyroïdie une baisse significative des hormones thyroïdiennes après une course longue distance ou après un entrainement. Chez le lévrier, seule T4 totale est diminuée par l'entrainement, les autres hormones (T4 libre, T3, TSH) ne sont pas modifiées (Hill, Fox et al. 2001b). L'exercice semble bien responsable d'une diminution des hormones thyroïdiennes.

La cause de ces valeurs basses au repos et le mécanisme de diminution au cours de l'exercice ne sont pas connus. Plusieurs hypothèses ont été avancées : modification des protéines de transport à cause d'une concentration élevée en AGLP (liée à une alimentation hypergrasse), balance énergétique négative, excitation liée à la course, modification de la distribution et/ou du métabolisme des hormones par l'exercice; mais aucune d'entre elles n'est vraiment satisfaisante (Panciera, Hinchcliff et al. 2003), (Lee, Hinchcliff et al. 2004), (Evason, Carr et al. 2004), (Hill, Fox et al. 2001b).

Dans la mesure où les hormones thyroïdiennes sont aussi responsables d'une augmentation du métabolisme de base, et d'une augmentation de la consommation en O_2 c'est-à-dire de la fréquence cardiaque basale, (Wolter 1987) et (Panciera, Hinchcliff et al. 2003) parlent d'un « certain hypothyroïdisme physiologique » chez les chiens de sport, peut-être causé par l'exercice, et le considèrent comme une **adaptation à l'effort :** l'hypothyroïdie permettrait une épargne énergétique par baisse du métabolisme de base, et une amélioration des qualités cardiovasculaires par diminution de la consommation en O_2.

En somme nous venons de voir que les chiens de sport, lévriers et chiens de traineau, présentent une minoration des hormones thyroïdiennes et celle-ci permettrait (des investigations supplémentaires sont encore nécessaires !) de réduire leurs besoins énergétiques et d'améliorer leurs qualités cardiovasculaires.

4. Le muscle du chien, un organe anatomiquement et physiologiquement adapté au métabolisme de l'effort

Avant de pouvoir préciser les particularités rencontrées chez le chien, nous allons présenter un bref rappel sur la nature des fibres musculaires.

a) *Généralités sur les fibres musculaires*

Classiquement on classe les fibres musculaires selon leurs activités en Myosine ATPase (enzyme permettant le travail musculaire) et en Succinate DéHydrogénase ou SDH (enzyme du cycle

de Krebs, qui catalyse la transformation du succinate en fumarate). On en distingue 3 types (Wolter 1987) :

-les fibres de type I ou **« lentes »,** au métabolisme essentiellement oxydatif, qui assurent des efforts d'endurance ;

-les fibres de type IIb ou **« rapides »,** au métabolisme essentiellement glycolytique, qui permettent des efforts explosifs tel que le sprint ;

-les fibres de type IIa, **intermédiaires** entre les 2 précédentes, au métabolisme mixte et permettant des efforts à la fois longs et intenses tels que des courses de moyenne distance.

Rappelons également un élément important vu au §I.F.1 page37 sur les systèmes de défenses antioxydants enzymatiques : les principales enzymes antioxydantes (SOD, GPX, et CAT) présentent une activité ou une concentration plus élevée dans les fibres de type I que dans les fibres de type II (Powers, Criswell et al. 1994), (Deaton and Marlin 2003). Autrement dit les fibres qui présentent un métabolisme essentiellement oxydatif ont aussi un arsenal antioxydant plus important, ce qui témoigne d'un risque d'exposition au Stress Oxydant plus élevée pour les fibres de type I.

La classification des fibres musculaires ainsi que les caractéristiques des 3 types de fibres sont reprises dans le Tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11. Principales caractéristiques des 3 types de fibres musculaires. D'après Wolter (1987)

Fibres musculaires	I ou lentes	IIa, intermédiaires	IIb ou rapides
Appellations anglophones (en haut selon (Burke, Levine et al. 1971) ; en bas selon (Peter, Barnard et al. 1972))	*Slow-twitch fatigue resistant (SR)*, ou *Slow-twitch oxidative (SO)*	*Fast-twitch fatigue-resistant (FR)*, ou *Fast-twitch oxidative-glycolytic (FOG)*	*Fast-twitch fatigable (FF)*, ou *Fast-twitch glycolytic (FG)*
Activité myosine ATPase	+	+++	+++
Activité SDH	+++	+++	+
Voies métaboliques	oxydation>>glycolyse	oxydation=glycolyse	glycolyse>>oxydation
Substrat principal	lipides	lipides et glycogène	glycogène
Activité/concentration en SOD, GPX, et CAT (d'après (Powers, Criswell et al. 1994), (Deaton and Marlin 2003))	+++	+	+
Rapidité de contraction	non	oui	oui
Durée de contraction	longue	moyenne	brève
Force fournie	modérée	modérée à forte	forte
Conséquence : types d'effort	endurant	long et rapide	explosif

Pour un même individu, la typologie musculaire est variable suivant le muscle considéré : en effet la proportion des différents types de fibres musculaires dépend de l'effort effectué par le muscle, autrement dit de sa fonction. Chez le chien, Gunn (1978) a classé les fibres musculaires en 2 groupes selon leur activité en myosine ATPase (élevée ou basse), et a trouvé que la proportion de fibres à faible activité en myosine ATPase est de 3% dans le muscle semi-tendineux, 19% dans le pectoral transverse, et 23% dans le diaphragme.

Par ailleurs, Hoppeler et Flück (2002) et Gerth et al. (2009) ont mis en évidence respectivement chez l'homme et chez le chien une plasticité musculaire, c'est-à-dire des ajustements de la composition cellulaire pour s'adapter aux besoins. Chez le cheval, Guy et Snow (1977) ont montré une augmentation des enzymes musculaires d'un muscle sollicité par l'entrainement, qui concerne autant les enzymes des voies aérobies que celles des voies anaérobies (LDH, CK, AlAT, AsAT, aldolase, citrate synthase). Ils ont également montré une conversion de fibres IIb en fibres IIa induite par l'entrainement, autrement dit une amélioration de l'endurance tout en maintenant la vitesse ; la proportion de fibres I quant à elle est peu modifiée. Cette conversion de fibres IIb en IIa a été retrouvée chez l'homme par Ingier (1979).

L'étude sur les généralités achevée, nous pouvons alors nous pencher sur les spécifités de la typologie musculaire du chien.

b) *Typologie musculaire du chien*

Le chien présente la particularité d'avoir une **activité en SDH importante dans la quasi-totalité des fibres**, ce qui rend complexe la classification des sous-types de fibres II ou rapides (Gunn 1978). C'est pourquoi Gunn (1978) et Kuzon et al. (1989) bien plus tard se sont contentés de classer les fibres musculaires du chien en 2 catégories suivant l'activité en myosine ATPase : faible activité = fibres de type I ; activité élevée = fibres de type II. De même que Armstrong et al. (1982) qui ont utilisé uniquement cette dichotomie fibres I vs fibres II compte tenu de l'activité oxydative importante de toutes les fibres II et semblable à celles de type I. Ils ont également montré la très grande diversité de distribution des fibres selon le muscle considéré, pour un même chien.

En ce qui concerne les sous-types de fibres II, Snow et al. (1982) rapportent que chez le chien il y a bien des fibres IIa, et qu'il n'y a pas de fibres IIb mais des fibres propres au chien appelées IIx, intermédiaires entre les IIb et les IIa. En comparant différentes méthodes de marquages des fibres, Latorre et al. (1993) ont montré que la distinction des sous-types de fibres II chez le chien dépend de la méthode utilisée : il apparait toutefois qu'il y a bien des fibres IIa et des fibres IIx propres au chien différentes des IIb décrites chez les autres espèces.

Enfin plus récemment, Acevedo et al. (2006) et Toniolo (2007) ont choisi d'utiliser les isoformes de la chaîne lourde de la myosine pour établir une classification des fibres chez le chien : ils ont retrouvé les résultats précédents à savoir que les **IIb sont rares à inexistantes chez le chien**, et que ce dernier **possède des fibres spécifiques IIx, dont les caractéristiques sont intermédiaires entre les IIb et les IIa** : par ordre décroissant de rapidité de contraction IIx>IIa>I. Acevedo et al. (2006) ont de plus retrouvé que l'activité en SDH est importante dans la totalité des fibres du chien avec par ordre décroissant d'activité : IIa>I>IIx.

Ainsi nous pouvons modifier le tableau des caractéristiques des fibres musculaires dans le cas du chien : voir Tableau 12 ci-dessous.

Tableau 12. Caractéristiques des fibres musculaires chez le chien : on retrouve les fibres I et IIa, avec en plus les fibres IIx. Pour comparer les fibres IIx du chien et IIb des autres espèces, nous avons reporté les caractéristiques des IIb. SDH : Succinate DéHydrogénase.

Fibres musculaires	**I ou lentes**	**II ou rapides**		***IIb des autres espèces (pour rappel)***
		IIa, intermédiaires	**IIx**	
Activité myosine ATPase	+	+++	+++	+++
Activité SDH	+++	++++	+++	+
Voies métaboliques	Oxydation >> glycolyse	Oxydation > glycolyse	Oxydation = glycolyse	Glycolyse >> oxydation
Rapidité de contraction	non	oui	oui +	oui +
Durée de contraction	longue	moyenne	brève	brève
Force fournie	modérée	modérée à forte	forte	forte
Conséquence : types d'effort	endurant	long et rapide	explosif	explosif

Pour ce qui est de la différence entre les races de chiens, Gunn (1978) a montré que le Greyhound, race adaptée à l'effort de sprint, possède quelque soit le muscle considéré la proportion de fibres I -ou lentes- la plus faible (entre 3 et 27% selon le muscle vs 18 à 53% chez d'autres races), autrement dit la proportion de fibres II -ou rapides- la plus forte. Chez des chiens proches d'un phénotype 'croisé', Kuzon (1989) a trouvé des proportions encore plus élevées en fibre I ou lentes : 45 à 71% selon le muscle considéré et suivant la race du chien.

A notre connaissance aucune donnée n'a été publiée sur les chiens de races nordiques, mais tout laisse à penser qu'on devrait trouver une plus forte proportion en fibres I (lentes).

c) *Comparaison avec d'autres espèces*

Compte tenu de la typologie musculaire spécifique du chien (métabolisme essentiellement oxydatif) et de la variabilité suivant le muscle considéré, il est délicat de la comparer aux autres espèces.

Nous pouvons cependant comparer la proportion des fibres I et II (pour rappel : la distinction entre les 2 types se fait d'après l'activité en myosine ATPase), pour des muscles de la locomotion : voir Tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13. Proportion des 2 types de fibres musculaires dans des muscles des la locomotion chez différentes espèces et pour différentes races. Fibres I : fibres lentes, à faible activité en myosine ATPase ; Fibres II : fibres rapides, à forte activité en myosine ATPase.

Espèce	Race	Fibres I, en % de fibres musculaires	Fibres II, en % de fibres musculaires	*Références*
Chat	commune	9 à 30	70 à 91	*(Maxwell, Barclay et al. 1977)*
Cheval	Pur Sang	10	90	*(Snow and Guy 1980)*
	Arabe	15	85	
	Trotteur, Poney	20	80	
Chien	Lévrier	0 à 11	89 à 100	*(Guy and Snow 1981)*
	Lévrier	3 à 37	63 à 97	*(Gunn 1978)*
	croisée	15 à 39	61 à 85	*(Guy and Snow 1981)*
	Foxhound	20 à 44	56 à 80	
	commune	24 à 55	45 à 76	*(Maxwell, Barclay et al. 1977)*
	commune	18 à 53	47 à 82	*(Gunn 1978)*
	croisée	42 à 72	28 à 58	*(Kuzon, Rosenblatt et al. 1989)*
	Beagle	50 à 74	26 à 50	
Homme		60	40	*Howald 1982*

On s'aperçoit alors que le chien possède une importante proportion en fibres lentes (exception faite du lévrier chez qui ce sont les fibres rapides qui prédominent largement) ; elle est nettement supérieure à celle du chat ou du cheval, et proche voire supérieure à celle de l'homme. Qui plus est le métabolisme de toutes les fibres du chien (sauf le lévrier) est majoritairement oxydatif, à la différence de toutes les autres espèces. Cette prédominance du métabolisme oxydatif a des conséquences en matière d'alimentation du chien de sport.

5. Conséquences alimentaires des spécificités métaboliques chez le chien

Sans rentrer dans un détail exhaustif de tous les besoins du chien de sport (not. pour les minéraux, vitamines, acides aminés), nous allons présenter les besoins alimentaires pour les 3 principales classes de macromolécules : protides, lipides, glucides.

Du fait de son besoin énergétique important (cf. § A page59) et de sa relative petite taille comparée à l'homme, le chien de sport doit avoir une alimentation très énergétique avec un volume minimal. Les lipides sont, parmi les 3 ingrédients pourvoyeurs d'énergie, ceux qui ont la plus importante concentration énergétique (voir Tableau 10 page64). Par ailleurs, le chien reste un carnivore c'est-à-dire que ses besoins protéiques ne doivent pas être négligés. Ainsi dans le cas du chien de sport, deux taux seront augmentés par rapport au chien à l'entretien : le taux protéique et le taux de matières grasses.

Remarque : chez l'homme, on a souvent favorisé une alimentation riche en glucides pour le sportif afin d'accroitre le stock de glycogène musculaire, d'autant qu'une alimentation riche en

matières grasses est susceptible d'entrainer des maladies cardiovasculaires. Nous allons voir que ces considérations ne sont pas applicables au chien.

a) *Cas du chien de traineau*

Depuis les travaux phares de Kronfeld et a l. (1977) et Hammel et al. (1977) à la fin des années 70 sur des Alaskan husky, il a été démontré qu'un régime riche en matières grasses et très pauvre en glucides apporte de larges bénéfices en terme de performance, en comparaison d'un régime avec contenant davantage de glucides et moins de matières grasses. Les conséquences de l'utilisation de telles rations sont :

- une augmentation des AGLP donc une meilleure disponibilité pour le muscle (l'utilisation des AGLP est directement liée à leur concentration plasmatique (Miller, Issekutz et al. 1963))
- l'absence d'hypoglycémie*, même avec très peu de glucides dans la ration ; cela témoigne des excellentes capacités de néoglucogénèse du chien,
- une diminution du risque de rhabdomyolyse post effort**,
- et enfin la prévention de « l'anémie du sportif »***, grâce à un taux important en protéines.

** l'hypoglycémie d'effort est connue chez le chien de chasse sous le nom d' « hystérie du chien de meute », elle survient dès 30 min d'effort par épuisement du glycogène hépatique (Wolter 1987).*
*** le mécanisme est similaire au « coup de sang » chez le cheval : une trop grande quantité de glycogène musculaire favorise une glycolyse rapide et intense d'où une acidose musculaire sévère (Hammel, Kronfeld et al. 1977).*
**** il s'agit d'un défaut d'apport protéique, fréquemment rencontré chez le chien de sport (Wolter 1987).*

Par contre il semblerait que le régime hypergras entraine une augmentation de la cholestérolémie et de la cétonémie (Kronfeld, Hammel et al. 1977).

Bien plus tard, Reynolds et al. (1994) ont également conclut à une meilleure efficacité de l'aliment riche en matières grasses versus celui riche en glucides : augmentation des AGLP et des TG sanguins (et insulinémie moins importante donc moins d'inhibition de la lipolyse c'est-à-dire meilleure mobilisation des acides gras), pas de prédisposition à la pancréatite , et meilleure vitaminémie E (celle-ci est stockée dans les graisses et donc relarguée en cas de lipolyse, et de plus les TG sanguins favoriseraient l'absorption de vitamines liposolubles).

b) *Cas du lévrier de course*

A l'instar de ce qui a été fait chez le chien de traineau, l'influence de différents régimes sur la performance et les paramètres biologiques chez le lévrier a été bien étudiée. Il ressort que l'optimum pour le lévrier est une alimentation riche en matières grasses, mais pas autant que le chien de traineau, et riche en protéines sans dépasser un certain seuil à partir duquel l'apport protéique apparait délétère (Toll, Pieschl et al. 1992), (Hill, Bloomberg et al. 1996), (Hill, Lewis et al. 2001a).

c) *Synthèse*

Dans ces 2 exemples extrêmes de chien de sport que sont le Lévrier et le Chien de Traineau, nous voyons donc bien que leur alimentation adaptée laisse une grande part aux matières grasses et

aux protéines. Le Tableau 14 présente une synthèse de recommandations en matière de composition de la ration chez le chien de sport pour différents efforts. Ces caractéristiques auront des conséquences importantes comme nous le verrons au § E.

Tableau 14. Composition de l'alimentation en lipides (Lip), protides (Prot), et glucides (Gluc) recommandée chez le chien de sport, pour différents efforts. A gauche : en kilocalories pour 100 kilocalories d'énergie métabolisable (%EM) ; à droite : en g pour 100g de matière sèche (%MS). Données issues de plusieurs auteurs.

Types d'effort	Références	en % d'EM				en % de MS		
		Lip	Prot	Gluc		Lip	Prot	Gluc
Entretien	(Grandjean, Moquet et al. 2002)	14	23	63		7	25	68
	National Research Council	>13	>19	<68		>5	>22	<60
Lévrier	(Hill, Lewis et al. 2001a)	33	24	43		18	29	53
	(Hill, Bloomberg et al. 1996)	38	23	39		21	29	49
	(Grandjean, Moquet et al. 2002)	39	24	38		22	30	48
	(Wolter 1987)	22	34	<44		10	35	<45
Chien de Traineau (mid distance)	(Hammel, Kronfeld et al. 1977)	61	39	0		41	59	0
	(Grandjean, Moquet et al. 2002)	43	27	30		25	35	40
	(Wolter 1987)	49	25	25		30	35	35
Chien de Traineau (longue distance)	(Reynolds, Fuhrer et al. 1994)	60	25	15		40	38	23
	(Grandjean, Moquet et al. 2002)	55	28	17		35	40	25
	(Wolter 1987)	64	25	11		<40	35	>15

Pour résumer, nous retiendrons la prépondérance de la voie oxydative et la valorisation d'un régime hypergras pour le chien de traineau longue distance, et la quasi exclusivité de la voie glycolytique avec une alimentation modérée en matières grasses chez le lévrier de course.

En complément de ces particularités métaboliques, l'appareil cardiovasculaire du chien a également évolué pour s'adapter et couvrir les besoins énergétiques importants liés à l'effort. Nous allons étudier ces adaptations.

C. Adaptations cardiovasculaires et respiratoires chez le chien de sport.

Comme nous l'avons abordé au § B.1 ci-dessus, le facteur limitant de la voie oxydative est le débit d'oxygène que peut recevoir la cellule musculaire, alors que pour la glycolyse il s'agit de l'acide lactique qui constitue un déchet. Les adaptations cardiovasculaires et respiratoires seront ainsi plus

importantes dans le cas d'un effort moyen à endurant -métabolisme oxydatif- puisqu'elles permettront d'augmenter l'apport d'oxygène, que dans le cas d'un sprint -métabolisme glycolytique.

1. Adaptations pour l'effort de sprint

Une des adaptations à l'effort de sprint que l'on retrouve aussi bien chez l'homme, que chez le cheval et le chien est un poids du cœur important, relativement au poids du corps (Gunn 1989). Et parmi ces 3 espèces c'est chez le chien que l'on retrouve les rapports poids du cœur/poids du corps les plus élevés : de l'ordre de 0,8 à 1,0% pour des chiens de race commune, et entre 1,3 et 1,5% chez le Greyhound, ce qui est nettement supérieur à ce que l'on observe chez l'homme (0,5% selon Grandjean et al. (2002)), et même au cheval (0,8% pour les races communes et 0,9% pour des Pur Sang) (Gunn 1989). Ces valeurs de ratio sont reprises dans le Tableau 15 suivant.

Tableau 15. Comparaison du poids du cœur relativement au poids du corps chez l'homme, le cheval et le chien: on s'aperçoit que le chien, en particulier le Greyhound possède le ratio le plus élevé.

Espèce/Race	Ratio poids du cœur / poids du corps (%)
Homme	0,5
Cheval/Commune	0,8
Cheval/Pur Sang	0,9
Chien/Commune	0,8 à 1,0
Chien/Greyhound	1,3 à 1,5

Par ailleurs les Greyhounds présentent une fréquence cardiaque de base plus basse que des chiens d'autres races, y compris des chiens sportifs : au repos, elle est de 29-50 bpm pour un Greyhound, 46-60 bpm pour un chien de traineau, et entre 70 et 140 bpm pour un chien de race commune selon son gabarit (Combrisson 1991). A l'effort, celle-ci peut atteindre 250 voire 300 bpm (Combrisson 1991), à l'instar d'autres chiens de sport, alors que chez l'homme elle varie entre 170 et 210 bpm (Grandjean, Moquet et al. 2002). Le Tableau 16 ci-dessous résume les valeurs de fréquence cardiaque chez le chien de sport.

Tableau 16. Comparaison de la fréquence cardiaque au repos chez différentes races de chiens, et à l'effort. bpm : battements par minute.

Race	Fréquence cardiaque au repos (bpm)	Fréquence cardiaque à l'effort (bpm)
Greyhound	29-50	250-300
Chien de Traineau	46-60	
Commune	70-140	

Au niveau hématologique, les Greyhounds présentent des adaptations à l'effort bref. Les valeurs de la lignée rouge sont plus importantes que dans les autres races : hémoglobinémie de 17-23g/dl; hématocrite de 50-68%; globules rouges de 6,7-9,2*10^6/µl (Campora, Freeman et al. 2011) ; les valeurs usuelles chez le chien sont respectivement : 14,1-20,0g/dl ; 43,3-59,3% ; 6,1-8,7*10^6/µl (Willard and Tvedten 2004).

2. Adaptations pour l'effort modéré à endurant

a) *Généralités*

(1) Notion de VO_2max

Pour caractériser la capacité d'un organisme à fournir de l'énergie en condition aérobie, on utilise la notion de consommation d'oxygène par l'organisme par unité de temps, notée **VO_2**, exprimée en ml/kg/min. Sa détermination est délicate car nécessite un appareil sophistiqué à placer sur la gueule de l'animal (Gogny and Souilem 1995), (Combrisson 1991).

Au cours d'un exercice d'intensité croissante, on s'aperçoit que la VO_2 augmente de manière progressive jusqu'à atteindre un plateau : à ce plateau, on parle de **VO_2max** c'est-à-dire de consommation maximale d'oxygène par un organisme par unité de temps, et le niveau de travail produit est alors maximal. Si l'intensité de l'effort nécessite une fourniture d'énergie supérieure à celle permise par la VO_2max l'organisme devra à nouveau faire appel à la voie anaérobie lactique (on se situe alors au seuil aéro-anaérobie), et l'effort ne pourra être maintenu pendant tout au plus une dizaine de minutes (Gogny and Souilem 1995), (Combrisson 1991).

La valeur de VO_2max est un très bon indicateur de la quantité de travail que peut produire un organisme : lors d'un effort plus la VO_2 d'un organisme est proche de sa VO_2max, plus l'effort sera bref, et inversement. D'ailleurs pour quantifier l'intensité d'un effort, les scientifiques parlent en « % de VO_2max ».

Ainsi une valeur élevée de VO_2max constitue une très bonne adaptation à l'effort.

(2) Les facteurs influençant la VO_2max

La VO_2 se définit comme le produit du débit cardiaque Q par la différence artério-veineuse de contenu en oxygène CaO_2 - CvO_2 :

$$VO_2 = Q * (CaO_2 - CvO_2)$$ (Combrisson 1991)

Le *débit cardiaque* est lui-même le produit de la fréquence cardiaque FC par le volume d'éjection systolique VES :

$$Q = FC * VES$$ (Combrisson 1991)

Le *contenu artériel en O_2* (CaO_2) dépend de la ventilation, de l'hémoglobinémie, et de la saturation en O_2 de l'hémoglobine. En ce qui concerne la ventilation on définit, par analogie au débit cardiaque, le débit ventilatoire D : il est le produit de la fréquence respiratoire FR et du volume efficace Veff (le volume efficace correspond au volume courant auquel on retire le volume de l'espace mort) (Gogny and Souilem 1995).

$$D = FR * Veff$$ (Gogny and Souilem 1995)

Le *contenu veineux en O_2* (CvO_2) dépend lui de la consommation d'oxygène par les tissus.

En somme, la VO_2 et la VO_2max dépendent de nombreux facteurs.

b) *Cas du chien de sport : une VO_2max élevée*

Des études réalisées sur différentes races de chiens ont montré que ce dernier possède une VO_2max élevée, entre 90 et 140 ml/kg/min (Cerretelli, Piiper et al. 1964), (Grandjean, Moquet et al. 2002), (Musch, Haidet et al. 1985), ce qui est nettement supérieur aux valeurs chez l'homme : 35-45 ml/kg/min pour un sujet sédentaire en bonne santé, 60-70 ml/kg/min pour un athlète bien entrainé, et jusqu'à 75-85 ml/kg/min chez des skieurs de fond olympiques (Cerretelli, Piiper et al. 1964), voir Tableau 17 ci-dessous.

Tableau 17. Valeurs comparées de la VO2max chez l'homme et le chien : le chien possède une VO_2max et donc un niveau de travail aérobie bien plus élevé que l'homme.

Espèce	Valeur de VO_2max (ml/kg/min)
Chien	90-140
Homme sédentaire	35-45
Homme sportif	60-70
Skieur Jeux Olympiques	75-85

On retrouve d'ailleurs cette différence entre le chien et l'homme sur la Figure 19 page65 où la VO_2 chez l'homme est rapidement plafonnée, alors que chez le chien elle continue d'augmenter.

Plusieurs adaptations sont responsables de cette puissance aérobie élevée.

(1) Un débit cardiaque important

Au repos, le **débit cardiaque Q est plus élevé** chez le chien que chez l'homme car le VES qui suit le poids du cœur est plus élevé (voir § 1 page73). Il est de l'ordre de 2 à 6l/min selon le chien.

A l'effort, on constate chez le chien une **augmentation importante du débit cardiaque Q** qui peut tripler voire quintupler : chez des Foxhounds il passe de 6l/min au repos à 17l/min lors d'un effort maximal (Musch, Haidet et al. 1985), et chez le chien de traineau il peut passer de 2l/min au repos à 10l/min à l'effort (Gogny and Souilem 1995). On s'aperçoit qu'à l'effort le VES augmente peu et uniquement pour des fréquences cardiaques basses, par contre la FC augmente très sensiblement : chez ces mêmes Foxhounds, le VES passe de 50ml au repos à 60ml lors de l'effort maximal, alors que la FC passe de 120 à 290 bpm (Musch, Haidet et al. 1985).

Notons que l'***entrainement*** améliore surtout le VES (en augmentant la volémie et la force de contraction du myocarde (Combrisson 1991)) et a peu d'effets sur la FC de base (Musch, Haidet et al. 1985).

Les valeurs des paramètres circulatoires ces Foxhound (Musch, Haidet et al. 1985) et leurs modifications par l'effort et par l'entrainement sont récapitulées dans le Tableau 18 suivant.

Tableau 18. Récapitulatif des principaux paramètres cardiocirculatoires chez des Foxhound avant et après un effort, et modifications induites par l'entrainement, d'après Musch et al. (1985). l/min : litre de sang par minute ; bpm : battements par minute ; ml : millilitre de sang.

Paramètre	Valeur au repos	Valeur à l'effort	Influence de l'entrainement
Débit cardiaque Q (l/min)	6	17	↑
Fréquence cardiaque FC (bpm)	120	190	→
Volume d'éjection systolique (ml)	50	60	↑

(2) Une circulation périphérique optimisée

A la différence de l'homme, le chien est capable d'une **splénocontraction** lors d'un effort important (Longhurst, Musch et al. 1986). Cela permet une augmentation du nombre de globules rouges dans le sang, ainsi la capacité du sang à transporter l'oxygène est augmentée (autrement dit le CaO_2 augmente; voir formule de VO_2max page74) . Le mécanisme est une stimulation des récepteurs α-adrénergiques par les catécholamines (Longhurst, Musch et al. 1986). La mobilisation du réservoir splénique n'est pas immédiate, c'est pourquoi on observe au tout début d'un effort chez le chien un pic de tachycardie (Combrisson 1991).

Egalement on observe d'autres mécanismes à l'effort, non spécifiques du chien :

- une vasoconstriction dans les territoires non demandeurs d'énergie, tels que les viscères digestifs et la peau (exception faite des fenêtres thermiques, voir plus loin page79 le § D.3 à propos de la thermorégulation). Cette ischémie de certains territoires permet de maintenir un débit sanguin important dans les muscles. Comme pour la splénocontraction, le mécanisme est une stimulation des récepteurs α-adrénergiques (Longhurst, Musch et al. 1986).
- une hyperhémie musculaire à l'effort par vasodilatation des artérioles et fermeture des shunts artério-veineux. Dans ce cas-là le mécanisme est une stimulation des récepteurs β-adrénergiques suite à la libération des catécholamines.
- et une compression des veines par les muscles qui travaillent favorisant le retour veineux au cœur (Gogny and Souilem 1995).

(3) Une ventilation correcte

Rappelons la définition du débit ventilatoire D avue au § a)(2): il est le produit de la fréquence respiratoire FR et du volume efficace Veff (le volume efficace correspond au volume courant auquel on retire le volume de l'espace mort) (Gogny and Souilem 1995) :

$$D = FR * Veff \qquad \text{(Gogny and Souilem 1995)}$$

Comme dans le cas du débit cardiaque, on constate une augmentation significative du débit ventilatoire à l'effort : chez le chien au repos il est de 2-4 l/min, et il peut être multiplié par 10 lors

d'un effort (Gogny and Souilem 1995). **Dans un premier temps cette augmentation est permise par une augmentation de la FR** (voir la formule du débit ventilatoire au § a)(2)), très vite plafonnée à une certaine valeur du fait de la « synchronisation mouvements-respiration ». **Puis c'est le volume courant qui augmente** (Gogny and Souilem 1995).

A la différence du débit cardiaque, le débit ventilatoire est peu modifié par l'entrainement, et donc il ne permet pas une amélioration des performances (Gogny and Souilem 1995). Chez le chien (Stickland, Lovering et al. 2007) et l'homme (Eldridge, Dempsey et al. 2004), à la différence du cheval (Manohar and Goetz 2005), l'exercice entraine la formation de shunts artérioveineux intrapulmonaires qui permettent de maintenir un débit cardiaque important. Cela serait aussi la raison pour laquelle on retrouve très fréquemment chez le cheval et peu chez l'homme et le chien des hémorragies pulmonaires induites à l'effort, du fait de l'augmentation de la pression dans les capillaires pulmonaires (Manohar and Goetz 2005), (West, Mathieu-Costello et al. 1993).

Par contre le débit ventilatoire peut limiter les performances en cas d'affections respiratoires associées : bronchite, asthme d'effort. L'asthme du skieur par exemple, connue chez l'homme et chez le chien, correspond à une maladie des petites voies respiratoires lors d'un effort sous des températures basses. Elle touche notamment les chiens de traineau. (Davis, McKiernan et al. 2002).

3. Le statut thyroïdien…

Rappelons que nous avons entrevu la possibilité au § B.3.c) ci-dessus que les chiens de sport présentent un « certain hypothyroïdisme physiologique » leur assurant une diminution de la consommation basale en O_2 des tissus et ainsi une diminution de la FC basale.

En définitive, nous avons pu voir que le chien (exception faite du Greyhound) possède une puissance aérobie importante (VO_2max élevée), permise par de nombreuses particularités au niveau cardiovasculaire et respiratoire. Cela fait de lui un animal parfaitement adapté à l'effort moyen à endurant. Quant au lévrier de course, il présente lui aussi des adaptations mais pour l'effort bref et explosif.

Nous allons terminer l'étude des particularités de l'effort chez le chien par un paragraphe sur la thermorégulation à l'effort.

D. La thermorégulation chez le chien à l'effort

1. L'hyperthermie d'effort

Quelque soit la voie utilisée au sein du muscle pour la conversion d'énergie, le rendement reste faible (de l'ordre de 25% selon (Gogny and Souilem 1995)) ce qui signifie qu'une grande partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur (Iccullag and Iznel 2011). Chez le chien de traineau dans des conditions climatiques rudes, la ***thermogénèse*** est ainsi assurée par la chaleur dissipée par

la voie oxydative, ce qui permet une épargne des frais de thermorégulation et donc une excellente adaptation (Wolter 1987).

En dehors de ces conditions particulières, ce faible rendement énergétique est à l'origine d'une hyperthermie d'effort, aussi bien chez l'homme que chez le chien de sport. Chez le greyhound par exemple, après une course de sprint la température rectale peut atteindre 40,5-41°C (Rose and Bloomberg 1989); chez le chien de traineau, après un effort modéré sur tapis roulant elle peut atteindre 39,5-40,0°C (Ready and Morgan 1984). Dès lors l'organisme doit éliminer de la chaleur : c'est la ***thermolyse***.

La thermolyse chez le chien se distingue de celle chez l'homme ou le cheval par le fait que **le chien ne transpire pas** (du moins très peu, uniquement par les coussinets (Wolter 1987)). Celle-ci est alors assurée par d'autres mécanismes: par la polypnée thermique pour une grande part, mais aussi par des modifications de l'appareil circulatoire, et enfin par une irrigation spécifique du cerveau.

2. Thermolyse par polypnée thermique

La polypnée thermique est appelée plus communément chez le chien « l'halètement ». Le principe est d'évacuer la chaleur de l'organisme par convection avec l'air au niveau de la cavité buccale et des 1^{eres} voies respiratoires. Il s'agit bien d'une polypnéee et non d'une tachypnée : les mouvements respiratoires sont rapides et superficiels (la fréquence respiratoire peut monter jusqu'à 220-300 mouvements par minute selon Schmidt-Nielsen et al.(1970)). Ainsi seul l'air de l'espace mort est renouvelé et pas celui des alvéoles, ce qui permet d'éviter une alcalose. L'halètement se fait de plus à une fréquence précise : la *fréquence de résonance de la cavité thoracique*, afin de diminuer le travail musculaire associé.

Goldberg et al. (1981) décrivent 3 halètements possibles chez le chien :

- *Type I* - **Inhalation et exhalation par le nez** : cela permet de limiter les pertes de chaleur. C'est l'halètement en milieu froid ou pour une course à très faible vitesse.
- *Type II* - **Inhalation par le nez, et exhalation par la bouche et le nez** : il permet d'évacuer de la chaleur au niveau de la muqueuse nasale. Il est associé à une hypersécrétion nasale par la glande de Sténo.
- *Type III* - **Inhalation par les 2 voies, et exhalation par les 2** voies aussi : la quantité de chaleur évacuée est encore plus importante, et se fait au niveau de la muqueuse nasale et de la langue. En plus de l'hypersécrétion nasale, il y a aussi une vasodilatation au niveau de la langue et une hypersécrétion salivaire.

Lors d'un effort important le chien alterne entre les types II et III. Les 3 halètements précédents sont illustrés dans la Figure 20 ci-dessous :

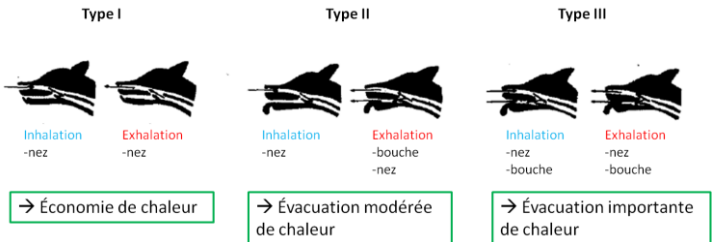


Figure 20. Mécanismes des 3 types d'halètement chez le chien. D'après Goldberg et al. (1981).

Remarque : en cas d'halètement vraiment important il peut y avoir ventilation des alvéoles et donc installation d'une alcalose respiratoire (diminution de la $PaCO_2$) : cela a été le cas chez des Labrador Retriever participant à une course de field-trial, mais les températures étaient particulièrement élevées pour une épreuve sportive ce qui a provoqué un halètement important (Steiss and Wright 2008) . Selon Combrisson (1991) cette alcalose respiratoire pourrait constituer un avantage chez le Greyhound car elle permettrait de limiter l'acidose métabolique causée par la voie anaérobie lactique. En pratique cette situation est relativement rare et l'alcalose est en général mineure.

Enfin la polypnée thermique a un inconvénient non négligeable : elle entraine une perte d'eau importante, non compensée par une diminution de la diurèse puisque l'ingéré énergétique entraine une augmentation de la charge ionique et donc une augmentation de la diurèse (Gogny and Souilem 1995). La polypnée thermique participe ainsi à la déshydratation de l'organisme, qui est le facteur le plus limitant de l'effort.

3. Thermolyse par des modifications circulatoires

Ces modifications ne sont pas spécifiques du chien. Lors d'une augmentation de la température centrale :

- le <u>retour veineux se fait par les veines superficielles</u> et non plus par les veines profondes, notamment au niveau des extrémités, afin de favoriser les échanges par convection avec le milieu ambiant. (voir Figure 21 ci-dessous)

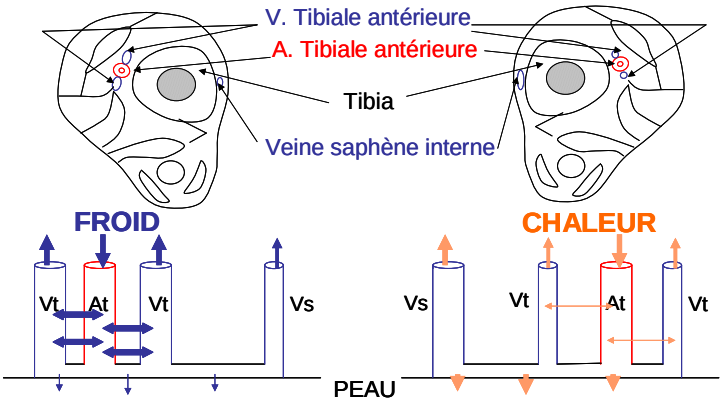


Figure 21. Modifications de la circulation sanguine veineuse au niveau d'une extrémité, le membre pelvien, chez le chien lors de lutte contre le froid à gauche (retour veineux par les veines profondes Vt) ou de lutte contre le chaud à droite (retour veineux par la veine superficielle Vs). At : artère tibiale ; Vt : veines tibiales ; Vs : veine saphène interne. Tiré du site de l'ENVT (ENVT 2009).

- le sang du tissu sous-cutané est redistribué du réseau capillaire profond vers le réseau capillaire superficiel, notamment au niveau des « fenêtres thermiques » (ventre, oreilles, museau) c'est-à-dire des surfaces corporelles jouant le rôle d'échangeurs de chaleur, là aussi pour augmenter la convection avec le milieu ambiant (voir Figure 22 ci-dessous)

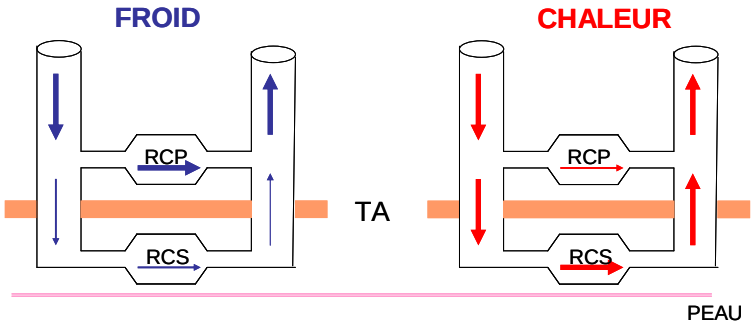


Figure 22. Modifications de la circulation sanguine sous-cutanée au niveau des 'fenêtres thermiques' chez le chien, lors de lutte contre le froid à gauche (redistribution vers le réseau capillaire profond) ou de lutte contre le chaud à droite (redistribution vers le réseau capillaire superficiel). RCP : réseau capillaire profond ; RCS : réseau capillaire superficiel. Tiré du site de l'ENVT (ENVT 2009).

4. Cas particulier du cerveau : thermolyse grâce à une adaptation de l'appareil circulatoire

Chez le chien une élévation importante de la température centrale est permise car elle n'est pas associée à une élévation de la température cérébrale. En effet chez les carnivores et les herbivores, la thermorégulation du cerveau est spécifique et permet une élévation de la température centrale en maintenant la température cérébrale à peu près constante : cela représente une adaptation à la prédation qui entraine autant pour le 'chasseur' que pour le 'chassé' une activité musculaire importante pour courir et donc une élévation de la température centrale. Le sang artériel 'chaud' provenant de l'artère carotide interne passe par un réseau de vaisseaux sanguins (le réseau carotidien) qui baigne dans un sinus veineux (le sinus cavernosus) dont le sang provient des premières voies respiratoires où il a été refroidi. Il y a ainsi une circulation à contre-courant d'un sang plutôt chaud (artériel) et d'un sang plutôt froid (veineux), d'où des échanges thermiques par convection. Suite à cela le sang qui va irriguer le cerveau via le cercle artériel cérébral est alors 'tiède', à une température compatible avec l'activité cérébrale. La Figure 23 ci-dessous schématise chez le chien cette irrigation spécifique des carnivores et herbivores.

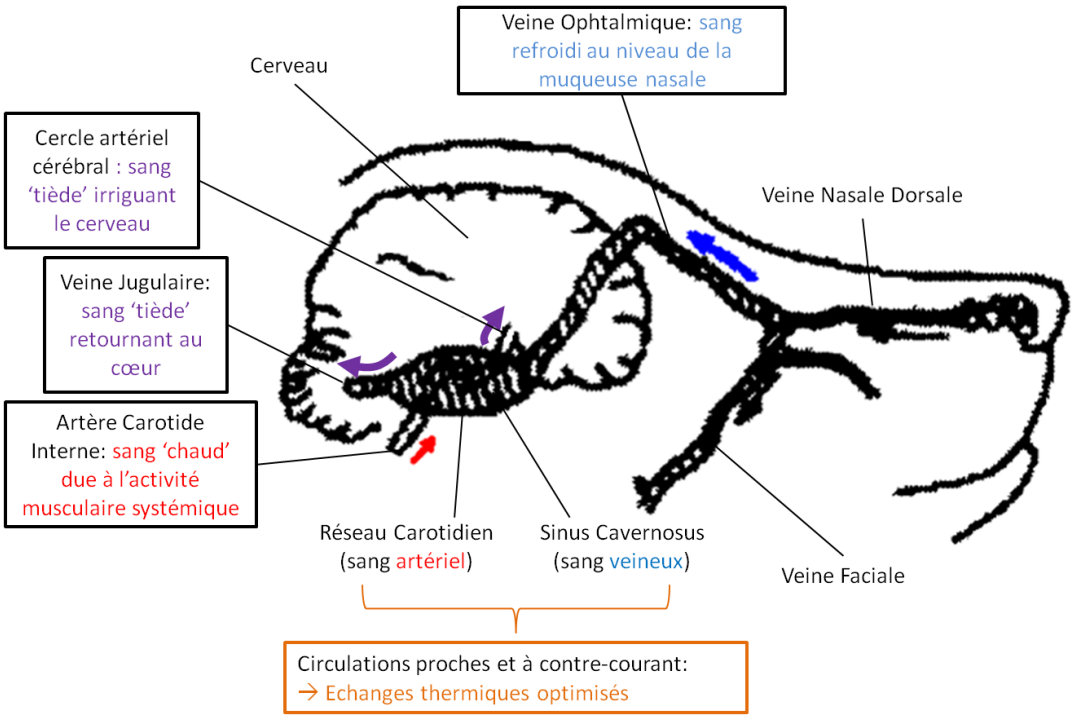


Figure 23. Irrigation spécifique du cerveau chez un carnivore, le chien, permettant une élévation de la température centrale sans élévation de la température corporelle : le sang 'chaud' (en rouge) de l'artère carotide est refroidi par convection par le sang 'froid' (en bleu) de la veine ophtalmique. D'après Ruckebusch et al. (1991).

Toutefois l'efficacité combinée de la polypnée thermique, des modifications circulatoires et de l'irrigation spécifique du cerveau restent limitée, et l'hyperthermie d'effort est souvent un facteur limitant.

En somme, le chien de sport possède de nombreuses spécificités -au niveau métabolique, cardiovasculaire, respiratoire, de la thermorégulation-qui font de lui un athlète bien différent de l'homme. Nous allons voir maintenant dans quelle mesure le chien est-il un bon candidat pour l'étude du stress oxydant.

E. Le chien de sport, un excellent candidat au Stress Oxydant

Nous allons récapituler au cours de ce paragraphe ce que nous avons vu précédemment -à la fois dans le paragraphe I.H.2 page52 sur les circonstances d'apparition du stress oxydant et dans les paragraphes A, B, C, D ci-dessus sur les spécificités du chien à l'effort- afin de montrer que le chien de sport présente de nombreuses caractéristiques pour être sujet au Stress Oxydant, et constitue ainsi un excellent modèle d'étude. Nous mettons de côté le fait que le stress oxydant est physiologiquement présent dans tout organisme aérobie puisque 1 à 3% d'O_2 échappe à la chaîne respiratoire et donne des EOR.

La circonstance majoritaire qui expose le chien de sport au Stress Oxydant est l'effort. Qu'il soit endurant -en condition aérobie- dans le cas des longues courses de chiens de traineau, ou très

bref -en condition anaérobie- dans le cas des sprints de lévriers, l'effort entraine une production importante d'EOR.

Dans le cas des efforts en anaérobiose, comme pour les lévriers, il semblerait que ce soit les lactates qui soient la source d'EOR. Or les lévriers ont justement une lactatémie très élevée lors des sprints, ce qui favorise la production d'EOR.

D'autre part, on constate que pour l'effort moyen à endurant, le chien utilise majoritairement la voie oxydative, avec pour substrat principal les acides gras libres plasmatiques, et possède une typologie musculaire très nettement tournée vers le métabolisme oxydatif. Cela est lié aux besoins énergétiques très élevés du chien de sport, et favorise la production d'EOR.

Du point de vue cardiorespiratoire, le chien fait partie des espèces qui présentent la VO_2max la plus élevée, ce qui signifie que le niveau de travail aérobie est un des plus élevés. Ainsi il est capable d'utiliser une plus grande quantité d'O_2, ce qui favorise l'apparition d'EOR.

En ce qui concerne l'alimentation des chiens de sport, nous nous apercevons qu'elle favorise l'apparition de stress oxydant. Cela concerne aussi bien le lévrier de course avec une alimentation hyperprotéique et moyennement grasse, que le chien de traineau avec une alimentation hypergrasse, puisque ces 2 types d'alimentation provoquent une augmentation du métabolisme aérobie et donc une augmentation de la production d'EOR.

Lors des compétitions, les chiens de sport sont soumis à un stress psychologique à cause du transport, du changement d'environnement, des autres chiens présents, de l'anticipation de l'épreuve. Ce stress psychologique favorise la production d'EOR, via une auto-oxydation des catécholamines.

D'autre part, en ce qui concerne les chiens de traineau qui courent en altitude, on observe que l'hypoxie et l'hypobarie engendrent une production accrue d'EOR, d'autant plus importante que l'altitude augmente. Les températures basses sous lesquelles ils courent sont également responsables de cette production d'EOR et d'une chute des défenses antioxydantes.

Enfin, de manière plus anecdotique, nous pouvons également mentionner que le chien présente une hyperthermie d'effort relativement importante, d'autant plus importante que l'effort est bref et intense, et favorisée par l'irrigation spécifique du cerveau qui permet de laisser augmenter la température corporelle (se reporter au § D.4 page80). Or l'hyperthermie d'effort est aussi responsable de la formation d'EOR.

En somme, il apparait que le chien de sport possède de nombreuses caractéristiques qui le prédisposent au Stress Oxydant, et constitue ainsi un excellent modèle pour l'étude du stress oxydant. Le chapitre suivant va nous permettre de présenter les principales études menées chez le chien de sport sur le stress oxydant induit à l'exercice.

F. Etudes du stress oxydant chez le chien de sport

A notre connaissance, assez peu d'études sur le stress oxydant induit à l'exercice ont été menées chez le chien, contrairement à ce qui a été fait chez l'homme. Différents types d'effort ont entrainés du stress oxydant : chez des chiens de traineau en effort moyen (Baskin, Hinchcliff et al. 2000), (Hinchcliff, Reinhart et al. 2000), (Piercy, K. et al. 2000) et endurant (Piercy, K. et al. 2001), (Moquet 2000), chez des chiens de chasse en efforts moyen et endurant (Pasquini, Luchetti et al. 2010), chez des beagles en effort sous-maximal sur tapis roulant (Motta, Letellier et al. 2009), chez des chiens de recherche en effort intense (Grandjean, Renard et al. 2005c), et enfin chez le greyhound en effort explosif de sprint (Wyse, Cathcart et al. 2005). Les marqueurs utilisés lors de ces études sont récapitulés dans le Tableau 19 ci-dessous :

Tableau 19. Récapitulatif des principales études mettant en évidence un stress oxydant induit à l'exercice chez le chien, et marqueurs utilisés.Evol : évolution ; 8OH-dG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ; TAS : Total antioxidant status ; AGPI: acides gras polyinsaturés; AGS: acides gras monoinsaturés; dROMS: derivated reactive oxygen metabolites ; BAP : biological antioxidant potential; TPAO : total plasma anti-oxidant; EOR : espèces oxygénées réactives.

Réf.	Race de chiens, Type d'effort	Marqueurs dosés	Evol	Caractéristique du marqueur
(Baskin, Hinchcliff et al. 2000)	Alaskan Husky, 70km à 19km/h	**8OH-dG**	↑	Produit d'oxydation de l'ADN
(Hinchcliff, Reinhart et al. 2000)	Chien de traineau, 58km à 19km/h	**Isoprostanes**	↑	Produit d'oxydation d'AGPI
(Piercy, K. et al. 2000)	Chien de traineau, 77km à 17 km/h	**Vitamine E** **TAS**	↓ ↓	Antioxydant liposoluble Statut antioxydant total
(Piercy, K. et al. 2001)	Chien de traineau, 1700km en 9-15j à 7km/h	**Vitamine E** **TAS**	↓ ↓	Antioxydant liposoluble Statut antioxydant total
(Moquet 2000)	Alaskan Husky, saison d'entrainement + courses (1700km en 10j, 700km en 6j, 250km en 3j)	**Isoprostanes urinaires** **Rapport AGPI/AGS érythrocytaires**	↑ ↓	Produits d'oxydation d'AGPI Oxydation des AG érythrocytaires
(Motta, Letellier et al. 2009)	Beagle, 4km à 7km/h	**Malondialdéhyde** **Paraoxonase-1** **Fluidité membranaire** **Vitamine E**	↑ ↓ ↓ ↓	Produit d'oxydation d'AGPI Antioxydant enzymatique Reflet d'oxydation membranaire Antioxydant liposoluble
(Pasquini, Luchetti et al. 2010)	Lévrier de chasse, chasses de 20min et 4h	**dROMS** **BAP**	↑ ↓	Métabolites dérivés des EOR Capacité antioxydante totale
(Wyse, Cathcart et al. 2005)	Greyhound, sprint 480m à 50km/h	**Ethane exhalé**	↑	Produit d'oxydation d'AGPI
(Grandjean, Renard et al. 2005c)	Malinois, recherche de victimes pendant 20min	**Vitamine E** **TPAO**	↓ ↓	Antioxydant liposoluble Capacité antioxydante totale

A l'opposé, une étude chez le Greyhound n'a pas permis de mettre en évidence de stress oxydant après un sprint de 500m (Marshall, Scott et al. 2002).

Par ailleurs, les autres études conduites chez le chien de sport ont plutôt porté sur l'impact d'une supplémentation en antioxydant(s) : certaines ont montré un effet bénéfique de la supplémentation avec diminution des signes d'atteinte oxydative (Baskin, Hinchcliff et al. 2000), (Motta, Letellier et al. 2009), (Grandjean, Renard et al. 2005c) ou amélioration des performances (Donoghue, Kronfeld et al. 1993), (Grandjean 1997); par contre d'autres ont mis simplement en évidence une augmentation des concentrations en antioxydants par la supplémentation sans modification sur le stress oxydant (Piercy, K. et al. 2000), (Dunlap, Reynolds et al. 2006), voire même un effet délétère de la supplémentation sur la performance(diminution de la vitesse moyenne) (Marshall, Scott et al. 2002).

Pour conclure, nous retiendrons que l'effort chez le chien de sport produit des métabolites issus d'une oxydation et consomme des antioxydants, c'est-à-dire qu'il est source de stress oxydant. L'intérêt d'une supplémentation en antioxydant ne semble pas encore bien établi et diffère selon les études. Concernant le chien de traineau ces études ont essentiellement porté sur des courses d'endurance ou de moyenne distance. En France, où les reliefs présentent un important dénivelé, il s'est développé des courses de traineau à chiens sur de courtes distances (10-15km) qualifiées de sprint. Il s'agit d'un effort intermédiaire entre les courses d'endurance de traineau à chiens que nous retrouvons sur le continent nord-américain, et les courses de sprint des lévriers. L'objectif que nous nous sommes fixés dans le cadre de notre travail expérimental a été d'étudier et d'évaluer, par le biais de différents paramètres, l'importance d'un éventuel stress oxydant chez des chiens participant à ce type d'épreuves de sprint.

CONTRIBUTION PERSONNELLE : étude expérimentale du stress oxydant chez le chien de traineau en course de sprint, au cours d'une course du Défi Rhône Alpes 2011.

« La partie du corps la plus importante pour un chien de traineau se situe entre les 2 oreilles », Charlie Champaine, musher.

I. Présentation du sport de traîneau à chiens en France (FFST), (FFPTC).

A. Historique en France

En France, les premières courses de traîneau à chiens remontent à la fin des années 80, ce qui en fait une discipline sportive relativement jeune. Le sport de traineau à chiens et ses variantes sont depuis placées sous l'égide de 2 fédérations : la Fédération Française de Pulka* et Traîneau à Chiens (FFPTC) et la Fédération Française des Sports de Traîneau, Ski-Pulka &Joering** et Cross-Canins*** (FFST) ; elles se distinguent l'une de l'autre par les chiens autorisés à participer : uniquement ceux appartenant à l'une des 4 races nordiques pour la FFPTC, tous les chiens pour la FFST. Notons d'ailleurs que la FFST est la seule reconnue par l'IFSS -International Federation of Sleddog Sports- et par le Ministère des Sports : c'est donc la fédération délégataire.

**La pulka est un sport pratiqué avec un seul chien qui tracte une sorte de traîneau de survie appelé 'pulka', et est relié au musher en ski de fond par une corde.*

***Le ski-joering est un sport pratiqué avec un seul chien relié par une corde au musher en ski de fond.*

****Le cross-canin est un ensemble de disciplines pratiquées sur terre, pour pallier le manque de neige dans certains pays européens. On trouve comme disciplines : un compétiteur courant seul avec un chien, un compétiteur pédalant sur un vélo avec un chien, un chien tractant une trottinette ou un scooter, ou enfin un attelage tractant un kart.*

B. Types d'épreuves

Concernant le traîneau à chiens, les courses se classent en 3 catégories :

- des épreuves rapides dites de **courte distance** ou '**Sprint'**, sur des distances de 6 à 25 km suivant la taille de l'attelage (de « 2 chiens » à « illimité »)
- des épreuves intermédiaires dites de **moyenne distance** ou **'Mid'**, entre 80 et 250 km, possiblement à étapes avec alors un minimum de 40 km par étapes.

- des épreuves d'endurance dites de **longue distance** ou **'Long'** couvrant plus de 250 km, généralement à étapes avec plus de 80 km par étapes.

Les courses longue distance sont originaires d'Amérique du Nord et un peu de Scandinavie où les espaces naturels permettent cette pratique. En revanche en Europe, la faible disponibilité en pistes a conduit à une explosion des Mid et surtout du Sprint, avec comme particularité des dénivelés plus importants que dans les pays du Nord.

C. Races de chiens utilisées

Parallèlement au développement des courses de Sprint et de Mid, la morphologie des athlètes canins a évolué (nous considérons ici seulement la FFST, puisque la FFPTC n'autorise que les 4 races nordiques, cf. supra): les Siberian Husky, Malamute, Groënlandais et Samoyède ont laissé place dans un premiers temps aux Alaskan Husky, et plus récemment aux Greyster, Scandinavian Hound, et chiens de chasse (Braque, Pointer). L'Alaskan Husky, le Greyster er le Scandinavian Hound ne sont pas des races reconnues officiellement. L'Alaskan Husky regroupe des chiens issus de nombreux croisements : à l'origine elle a été créée lors de la ruée vers l'or par des croisements entre les chiens de chasse (braque, pointer) des hommes blancs et les chiens nordiques locaux des autochtones. Le Greyster quant à lui est issu de croisements entre des Greyhounds et des chiens de chasse (braque, pointer). Et enfin le Scandinavian Hound correspond à des croisements entre des Alaskan Husky et des chiens de chasse (braque, pointer). Quelques-unes de ces races sont illustrées par les photos qui suivent (Photo 1 à Photo 11). Le choix de la race se fait en fonction de la catégorie de course : plus l'attelage est court, plus le gabarit des chiens doit être important, et généralement l'attelage croit avec la distance de course.

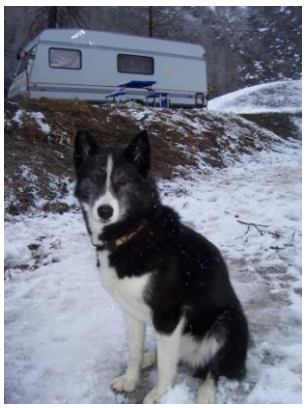


Photo 1 et Photo 2. Siberian husky. Photos de F.LENZI

Photo 3. Groënlandais. Photo de F.LENZI

Photo 4. Attelage '4 chiens' mixte: sur la gauche de la photo: 2 Siberian Husky; sur la droite de la photo: 2 Malamute. Photo de F.LENZI

Photo 5. Attelage '8 chiens' race nordique: Siberian Husky. Photo de F.LENZI

Photo 6. Attelage de Siberian Husky en pleine course. Photo de F.LENZI

Photo 7. Attelage d'Alaskan Husky, sur la "stake-out" (la zone de repos). Photo de F.LENZI

Photo 8. Chien de type 'chasse' de Ludovic KUPEZAK. Photo de F.LENZI

Photo 9 et Photo 10. Croisés Braque et Alaskan Husky de Christophe LO CASCIO. Photos de F.LENZI

Photo 11 et Photo 12. Greysters de Thierry LO CASCIO. Photos de F.LENZI

D. Règlement de course

Le règlement de la FFST est directement traduit de celui de l'IFSS et établit les règles en matière d'admissibilité, d'obligations matérielles et sanitaires, de transport des chiens (voir Photo 13), de comportement en course, et même de lutte anti-dopage !! Les traineaux utilisés lors des courses de sprint sont petits, légers, maniables, et doivent posséder un certain nombre d'équipements de sécurité (ex : un frein à pied pour freiner le traineau, une ou deux ancres pour l'immobiliser, un sac pouvant accueillir un chien fatigué ou blessé etc.). Voir Photo 14 et suivante.

Photo 13. Exemple d'aménagement d'un pick-up pour le transport des chiens. Photo de F.LENZI lors du DRA 2008

Photo 14 et Photo 15. Exemples de traineaux utilisés lors des courses de sprint. Le sac à l'avant du traineau permet de transporter un chien fatigué ou blessé. Photos de F.LENZI.

II. Etude du stress oxydant chez le chien de traineau lors d'une course de sprint du Défi Rhône Alpes 2011.

A. Matériels et méthodes

Notre étude s'est déroulée lors d'une étape (« le plateau de Beauregard ») du Défi Rhône-Alpes (DRA) 2011, course de sprint à étapes se déroulant sur une semaine. Les étapes correspondent aux différentes stations accueillant le DRA, chacune regroupant en général 2 manches.

1. Chiens de l'étude

Les chiens prélevés appartiennent à 4 attelages différents, dont les mushers Thierry LO CASCIO (TLC), Christophe LO CASCIO (CLC), Ludovic KUPEZAK (LK), et Philip SANGLA (PS) ont accepté généreusement de participer à l'étude (Photo 16 et Photo 17).

Photo 16. Les 4 mushers participant juste avant le départ de la course. En haut à gauche: Ludovic KUPEZAK ; en haut à droite: Philip SANGLA ; en bas à gauche: Christophe LO CASCIO ; en bas à droite: Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011

Photo 17. Les 4 attelages '4 chiens' participant à l'étude, juste avant le départ de la course. En haut à gauche: Ludovic KUPEZAK ; en haut à droite: Philip SANGLA ; en bas à gauche: Christophe LO CASCIO ; en bas à droite: Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011

Le programme d'entrainement de début de saison et le régime alimentaire étaient spécifiques à chaque équipage. Les attelages étaient constitués de 4 chiens chacun, soit au total 16 chiens, appartenant à des races voisines, souvent croisées, classiquement utilisées dans les courses de sprint. Il y avait 12 mâles et 4 femelles, avec une médiane d'âge de 3,5 ans. Tous les chiens sauf 2 (les numéros 2 et 16) ont couru l'ensemble du DRA. Les données sur les 16 chiens ont été recueillies après la course, à l'aide d'une fiche de renseignements envoyée à chaque musher. Celle-ci comportait différentes rubriques : coordonnées complètes du musher, données sur les chiens, alimentation, entraînement (voir Annexe I page129). Les données concernant les chiens sont rassemblées dans le Tableau 20. Tous les chiens étaient en bonne santé et correctement vaccinés, et ne recevaient aucun traitement médical au moment de notre étude.

Tableau 20. Résumé des données sur les 16 chiens de l'étude. F : femelle; M : mâle ; TLC: Thierry LO CASCIO; CLC: Christophe LO CASCIO; LK: Ludovic KUPEZAK; PS: Philip SANGLA. Rq: le numéro 15 n'apparait pas car il s'agissait d'un chien n'ayant pas couru, prélevé uniquement à T0 pour un contrôle biochimique.

Numéro	Chien	Race	Age (années)	Sexe	Musher	Participation au DRA (2 étapes de 2 manches)
1	Comette	Greyster	4	F	TLC	tout
2	Cobra	Greyster	8	F	TLC	1 seule manche
3	Excel	Greyster	1,8	M	TLC	tout
4	Mirny	Greyster	1,8	F	TLC	tout
5	Jules	Braque*Pointer*Alaskan	7,5	M	CLC	tout
6	Brun	Braque*Pointer*Alaskan	3	M	CLC	tout
7	Scoubidou	Pointer*Alaskan	6,5	M	CLC	tout
8	Jonas	Pointer*Alaskan	4	M	CLC	tout
9	Tiboune	Chasse	5	M	LK	tout
10	Sonic	Chasse	3	M	LK	tout
11	Flash	Chasse	3	M	LK	tout
12	Lilou	Chasse	3	F	LK	tout
13	Spirou	Greyster*Alaskan	4,5	M	PS	tout
14	Bilbon	Greyster	4,5	M	PS	tout
16	Fitz	Greyster*Alaskan	1,5	M	PS	2 manches
17	Albus	Greyster*Alaskan	1,5	M	PS	tout

2. Les conditions de course

La course s'est déroulée le dimanche 23 janvier 2011, il s'agissait de la 2e et dernière manche de l'étape Beauregard. Le site est le plateau de Beauregard, situé à Manigod (74230). La course était une boucle de 8,4km pour les attelages 4 chiens, avec un dénivelé conséquent : altitude départ : 1470m, altitude maximale : 1650m, altitude arrivée : 1530m (voir Figure 24).

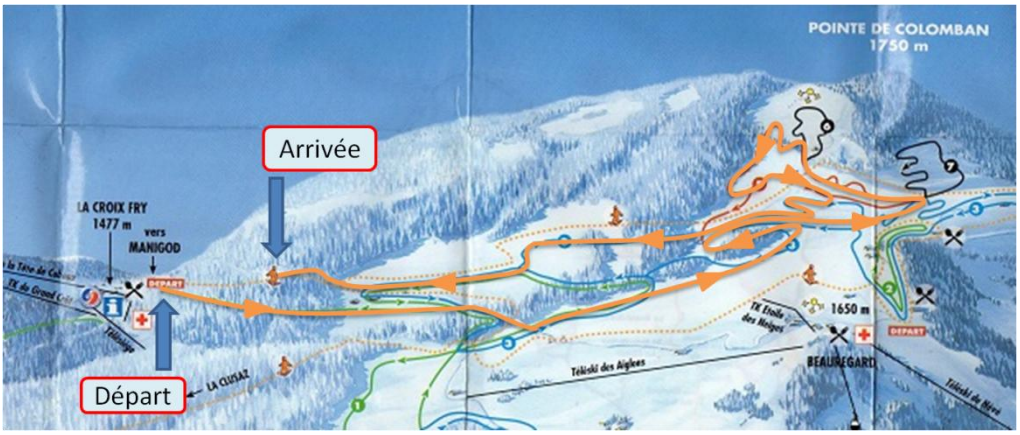


Figure 24. Plan du plateau de Beauregard et du parcours pour les attelages 4 chiens.

Les performances des 4 attelages étaient sensiblement les mêmes, avec un temps de course autour de 14 min soit une vitesse moyenne d'environ 36km/h (détails dans le Tableau 21). Les conditions climatiques étaient très bonnes, avec un fort ensoleillement et une température de l'air de -8 à -7°C.

Tableau 21. Performances en temps et vitesse moyenne des 4 attelages de l'étude ; distance du parcours = 8,4 km

attelage	temps de course (en min et sec)	conversion du temps (en min)	vitesse moyenne (km/h)
LK	13'23''	13,38	37,7
PS	14'19''	14,32	35,2
CLC	14'29''	14,48	34,8
TLC	14'30''	14,50	34,8
moyenne	*14'10''*	*14,17*	*35,6*
écart-type		*0,46*	*1,2*

3. Protocole expérimental

L'objectif de l'étude était de mettre en évidence l'apparition d'un stress oxydant suite à un effort intense chez des chiens de traineau lors d'une course de sprint.

Le principe était donc de doser différents marqueurs indirects du stress oxydant (voir § 4 ci-dessous à propos des dosages réalisés) avant et après la course de sprint. Chaque chien était ainsi son propre témoin.

La Figure 25 schématise les différentes étapes de l'expérience, que nous allons expliciter.

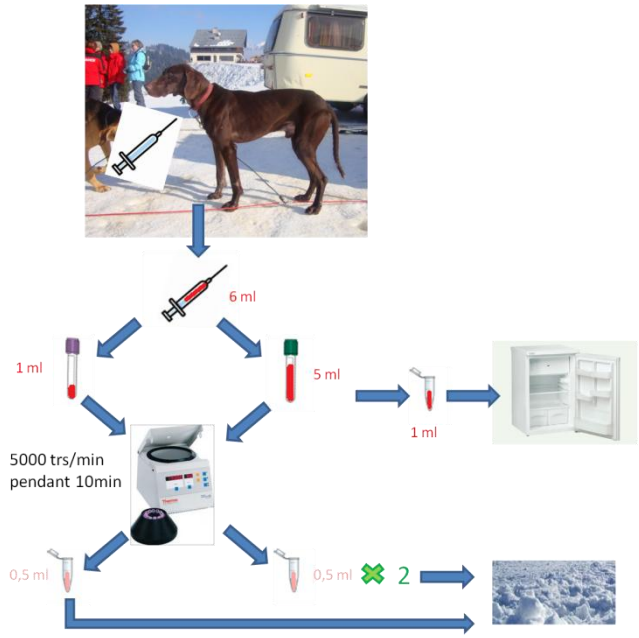


Figure 25. Représentation schématique du protocole expérimental. Le tube avec le 'bouchon violet' représente un tube EDTA ; celui avec le 'bouchon vert' représente un tube à héparine ; les tubes eppendorfs avec un contenu 'rouge' contiennent du sang total ; ceux avec un contenu 'rose' contiennent du plasma.

Les prélèvements ont été réalisés dans l'heure qui a précédé le départ (T0), et dans l'heure qui a suivi l'arrivée (T). Ils ont été effectués à une veine jugulaire afin de recueillir au moins 6 ml de sang, que nous avons réparti dans un tube EDTA (environ 1ml) et dans un tube à héparine (5ml ou plus). Voir la Photo 18 ci-dessous pour le prélèvement sanguin à la veine jugulaire.

Photo 18. Prise de sang à la veine jugulaire par Jean-Jacques THIEBAULT, sur un des chiens de Thierry LO CASCIO. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011

Chaque tube était identifié par un numéro de chien, attribué dans l'ordre chronologique des prélèvements : une feuille de correspondance « numéro du tube-nom du chien » était remplie au fur et à mesure, et permettait de noter d'éventuelles remarques sur l'état de santé du chien (voir Annexe II page130). Une fois le tube rempli, il était remué une dizaine de fois pour bien homogénéiser le prélèvement avec l'anticoagulant présent dans le tube (soit EDTA, soit héparine).

Puis le tube était traité : 1ml de sang hépariné était prélevé et disposé dans un tube eppendorf individuel au réfrigérateur -à environ +4°C- pour le dosage de la fluidité membranaire par RPE (voir Photo 21). Le reste du tube hépariné ainsi que le tube EDTA étaient ensuite centrifugés (Heraeus® Labofuge® 200) à 5000 tours/min pendant 10min (Photo 19).

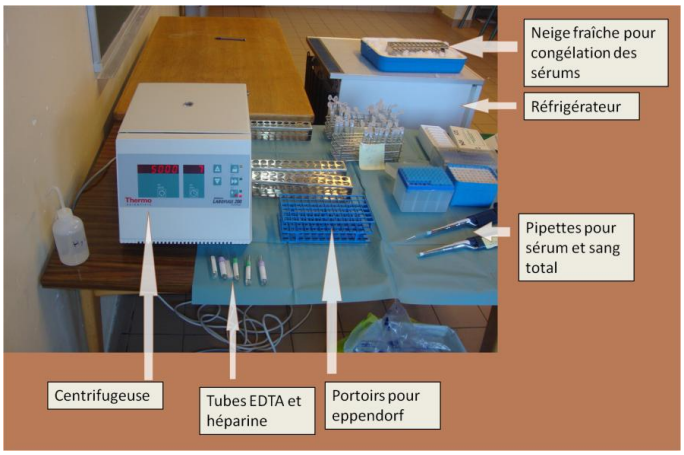


Photo 19. Matériel nécessaire au traitement des prises de sang. Photo de F.LENZI lors du DRA 2011

Le plasma de chaque chien était alors recueilli et réparti dans 3 tubes eppendorfs individuels (voir Photo 20):

- plasma issu du tube EDTA pour le dosage du MDA,
- plasma issu du tube à héparine pour le dosage de la protéinémie et des enzymes musculaires CK et AsAT,
- plasma issu du tube à héparine pour le dosage de l'activité de la PON.

Photo 20. Recueil des plasmas et répartition dans 3 tubes eppendorf pour chaque chien. Photo de J-J.THIEBAULT lors du DRA 2011.

Tous les tubes eppendorfs contenant du plasma ont été placés dans de la neige fraîche pour un refroidissement rapide. Les 2 photos suivantes illustrent les 2 méthodes de traitement par le froid utilisées selon les prélèvements : refroidissement des plasmas, et réfrigération du 'sang total'.

Photo 21 et Photo 22. Stockage au froid des différents prélèvements: à gauche dans de la neige fraîche pour congélation pour les plasmas; à droite au réfrigérateur pour éviter la congélation pour les 'sang total'. Photos de F.LENZI lors du DRA 2011

Remarque : chaque tube eppendorf était identifié au préalable de manière indélébile, avec le numéro du chien, le paramètre à doser, et le moment du prélèvement (Photo 23 ci-dessous).

Photo 23. Identification des tubes eppendorf : 4 tubes pour le chien n°1 (C1) avant la course (T0) : paraoxonase (PON), malondialdéhyde (ITE), enzymes musculaires et protéines totales (ENZ), fluidité membranaire par résonance paramagnétique électronique (RPE). Photo de F.LENZI lors du DRA 2011.

L'ensemble des prélèvements ont été placés dans une glacière, avec pains de glace pour les plasmas et sans pain de glace pour les 'sang total', puis rapatriés à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Les plasmas ont été congelés en vue de leur analyse ultérieure, et es prélèvements de sang total pour la RPE maintenus à +4°C ont été analysés dans les 24h qui ont suivi.

4. Dosages réalisés

a) *Paramètres biologiques : CK, AsAT, PT*

Nous avons dosés 2 enzymes musculaires: les Créatine Kinase (CK) et les Aspartate Amino-Transférase (AsAT) afin d'évaluer les dommages musculaires qui sont fréquemment associées au stress oxydant chez le sportif, ainsi que la protéinémie (PT) afin de juger l'état d'hydratation des chiens. Ces dosages ont été réalisés par spectrophotométrie à l'aide d'un analyseur Konelab 20 au laboratoire de biochimie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

b) *Analyse de la fluidité des lipides membranaires des érythrocytes (Motta, Letellier et al. 2009)*

La fluidité des lipides membranaires des érythrocytes est issue de mesures de résonnance de spin de l'électron, à l'aide d'un spectromètre (ECS 106® Bruker®) et d'un champ magnétique variable appliqué à la cavité résonnante (voir Figure 26). Pour plus de précisions sur la partie théorique de la RPE, se reporter au § I.G.3.a)(1) page46

Dans un premier temps les érythrocytes ont été lavés 3 fois avec une solution tampon PBS 0,2 mol/L (pH 7,4). Après centrifugation à 3500tr/min, 100 µl de culot globulaire ont été ajoutés à 100 µl de PBS. Ensuite le marquage des érythrocytes lavés a été réalisé avec la sonde 16-nitroxyde acide stéarique (16-NS) : ajout de 2 µl d'une solution contenant 0,01 mol/L de 16-NS dans du diméthylsulfoxide. 2 tubes capillaires en quartz ont permis de prélever chacun 20 µl du mélange, et ont été placés dans la cavité résonnante de type Tmh 259 du spectromètre.

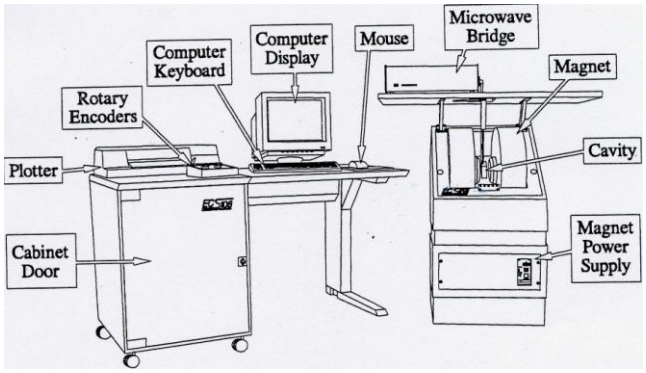


Figure 26. Schématisation du matériel utilisé pour la mesure de la fluidité membranaire par RPE.

Le temps de corrélation-relaxation (Tc), exprimé en ns, a été calculé à partir des spectres finaux obtenus à partir de 10 balayages. La formule utilisée est la suivante :

$Tc = 6{,}5*10^{-10} *W_0*(\sqrt{\frac{h0}{h-1}} + \sqrt{\frac{h0}{h+1}} - 2)$, où h_0, h_{-1} et h_{+1} correspondent à l'amplitude des trois raies observées sur le spectre, et W_0 à la largeur de la raie principale (voir Figure 27).

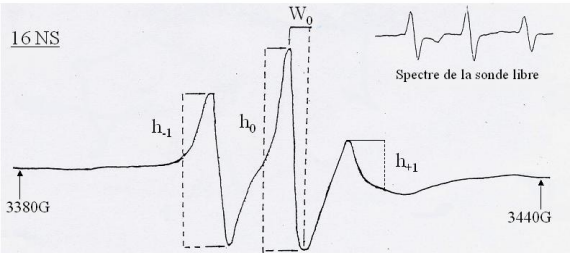


Figure 27. Détermination de Tc à partir du spectre d'absorption de la sonde 16-NS dans une membrane biologique.

Nous pouvons relier la viscosité membranaire (l'inverse de la fluidité membranaire) au temps de corrélation-relaxation par une formule mathématique : le problème est que cela nécessite une approximation grossière. C'est pourquoi il est préférable de conserver Tc comme variable, en retenant que **la fluidité membranaire est inversement proportionnelle à Tc.**

c) *MDA plasmatique (Motta, Letellier et al. 2009)*

Le malondialdéhyde plasmatique est un produit d'oxydation des lipides membranaires (voir § I.G.3.a)(2) page47 pour plus de précisions)

Le MDA plasmatique a été dosé en utilisant un kit commercial (Bioxytech MDA-586, Oxis) : celui-ci permet de doser le MDA total tout en minimisant les interférences liées aux autres produits de peroxydation (ex : 4-hydroxyalkenals). Le MDA interagit avec la N-méthyl-2-phénylindole (NMPI) à 45°C. Une molécule de MDA réagit avec 2 molécules de NMPI donnant une carbocyanine colorée. Celle-ci possède un maximum d'absorption à 586 nm, et est détectée par spectrophotométrie UV (Uvikon 640, UVK-Lab). La concentration en MDA est une fonction affine de la Densité Optique à 586nm.

d) *Activité de la PON1(Motta, Letellier et al. 2009)*

L'activité estérasique de la paraoxonase-1 est diminuée par les EOR, ce qui en fait un bon marqueur indirect du stress oxydant (se reporter au § I.F.1.d) page 38 pour plus de détails sur la PON)

Les mesures d'activité de la PON1 sont basées sur son activité estérasique sur le O, O-diéthyl-Op-nitrophényl phosphate (paraoxon), qui est dégradé en p-nitrophénol et en diéthylphosphate. Cette technique est celle employée au Laboratoire de Biochime de l'Hôpital Sud de Rennes.

L'activité de PON1 a été mesurée à 37 °C dans un tampon Tris-HCl 20 mmol/L (pH 7,8), contenant 2,5 mmol/L de paraoxon. 10µL de plasma sanguin ont été ajoutés à 990µL de substrat et la cinétique de libération du p-nitrophénol a été enregistrée pendant 30 min. Le coefficient d'extinction du p-nitrophénol a été fixé à 15200 et la densité optique (DO) a été mesurée à 405 nm par spectrophotométrie UV. L'augmentation de la DO est directement proportionnelle à l'activité de PON1. Les résultats sont exprimés en unités internationales (UI), avec 1 UI correspondant à 1 nmole de p-nitrophénol formée par minute et par ml de sérum.

5. Présentation des résultats et analyses statistiques

Les paramètres statistiques utilisés pour décrire chaque paramètre (moyenne, écart-type, minimum, maximum) ont été calculés à l'aide du **logiciel Windows® Excel® 2007**.

Par contre l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne a été calculé à l'aide du **logiciel R®** (éditeur : R Foundation for Statistical Computing ; version 2.10.1 du 14.12.2009) par la méthode du *bootstrap* ou ré-échantillonage : on tire au hasard 10 valeurs dans l'ensemble des valeurs de tous les chiens et on en calcule la moyenne ; on répète cette étape 1000 fois, et on classe les 1000 moyennes obtenues par ordre croissant ; les bornes inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance à 95% correspondent alors respectivement à la 25e valeur et à la 975e valeur. Cette méthode présente l'énorme avantage de pouvoir être appliquée à tout type de variable (moyenne, médiane, fréquence etc.) et qu'elle que soit la distribution de cette variable (normale ou non normale).

Les représentations graphiques et les tests statistiques ont également été réalisés à l'aide du **logiciel R®.**

La représentation des données dépendait du cas :

- pour les effets de l'effort de sprint, nous avons choisi les boîtes à moustaches ou « *boxplot* », car les effectifs étaient suffisants.

- pour les effets de l'attelage, de l'âge et du sexe des chiens, les effectifs étaient très petits ; nous avons donc opté pour un « *stripchart* » c'est-à-dire une représentation des valeurs de tous les chiens en fonction de la catégorie.

- pour la corrélation entre les paramètres, nous avons choisi la représentation de tous les diagrammes de dispersion entre les marqueurs, qui permet de vérifier que la relation est bien linéaire et qu'il n'y a pas de valeurs extrêmes.

Pour ce qui est des tests, nous avons préféré systématiquement les tests non paramétriques aux tests paramétriques en dépit de leur moins bonne puissance car nos effectifs étaient petits (<30) :

- ✓ Pour tester l'effet de l'effort de sprint sur la modification des paramètres du stress oxydant, nous avons utilisé le test des rangs signés de Wilcoxon sur échantillons appariés (test non paramétrique). La différence avant et après effort a été jugée au seuil de 5% c'est-à-dire **significative lorsque p<0,05.**
- ✓ Pour tester l'effet de l'attelage, de la classe d'âge et du sexe des chiens sur la valeur des paramètres du stress oxydant avant et après la course, nous avons réalisé une analyse de variance à l'aide du test des rangs de Kruskal-Wallis (test non paramétrique également). De même la différence a été jugée significative lorsque p<0,05. Les attelages ont été dénommés TLC pour celui de Thierry LO CASCIO, CLC pour celui de Christophe LO CASCIO, LK pour celui de Ludovic KUPEZAK, et PS pour celui de Philip SANGLA. Pour l'âge des chiens nous avons définis arbitrairement 3 classes d'âge comme suit : J pour les jeunes chiens jusqu'à 3 ans inclus ; A pour les adultes de 3 à 6 ans inclus ; V pour les plus vieux chiens de plus de 6 ans. Enfin pour le sexe nous avons utilisé F pour les femelles, et M pour les mâles.
- ✓ Pour rechercher une corrélation entre les différents marqueurs du stress oxydant, nous avons utilisé le test du coefficient de corrélation de rang de Spearman (test non paramétrique également), en calculant tous les coefficients 2 à 2 en une seule fois. La corrélation a été jugée bonne et significative lorsque le coefficient était supérieur à 0,703 en valeur absolue (valeur choisie d'après la table de Spearman donnée en Annexe III, pour p<0,01 et n=13 car 3 prélèvements sur 16 présentaient une hémolyse).
- ✓ Lorsqu' une corrélation linéaire était significative, nous avons réalisé une régression orthogonale car les 2 variables étaient des variables observées *(Rq : la régression linéaire s'applique entre une variable contrôlée et une variable observée)*

B. Résultats

1. Hémolyse de certains prélèvements

A T0, 3 prélèvements ont présenté une hémolyse trop importante qui a rendu impossible le dosage des paramètres biologiques (PT, AsAT, et CK) : il s'agit des prélèvements des chiens 9, 10 et 12. La Figure 28 suivante montre un de ces tubes après centrifugation : on peut y voir le plasma rouge foncé (normalement rosé) car coloré par l'hémoglobine des globules rouges éclatés, ainsi

qu'un culot clair correspondant à un mélange de globules rouges intacts et de cytosquelette issu de globules rouges éclatés.

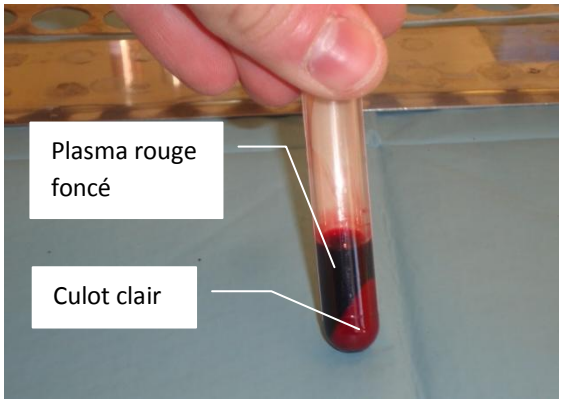


Figure 28. Photo d'un prélèvement où il y a eu une forte hémolyse, après centrifugation : le plasma est rouge foncé car coloré par l'hémoglobine des globules rouges éclatés, et il y a un culot clair correspondant à un mélange de globules rouges intacts et de cytosquelette issu de globules rouges éclatés. Photo de F.LENZI

Pour le paramètre MDA, à T0, 8 prélèvements ont présenté une hémolyse qui a rendu impossible le dosage par la technique utilisée : il s'agit des chiens 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12 et 16. L'effectif étant réduit nous avons préféré ne pas tester l'effet de l'attelage, de l'âge ou du sexe des chiens à T0, ni réaliser la corrélation avec les autres paramètres à T0 (cela aurait nécessité de ne garder que ces 8 chiens pour tous les paramètres, donc une perte d'informations)

2. Effet de l'effort de sprint

a) *Protéines totales (PT)*

Les protéines totales plasmatiques sont exprimées en g/L. La fourchette des valeurs usuelles retenue est de 53 à 76 g/L (Willard and Tvedten 2004).

Les distributions des valeurs de PT avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 29 qui suit :

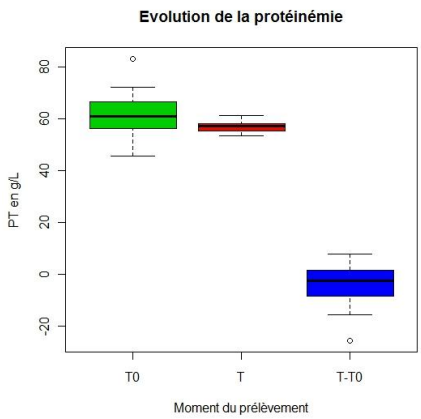


Figure 29. Distributions des valeurs de PT de 13 chiens avant (T0) et 16 chiens après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

A T0 sur les 13 chiens retenus les valeurs de PT s'étalent de 45,7 à 83,0, pour une moyenne de 62,1 (écart-type = 9,6). L'ensemble des chiens ont des valeurs comprises dans les valeurs usuelles, sauf 2 chiens : le chien 5 au-dessus avec 83,0, et le chien 17 en-dessous avec 45,7.

A T les valeurs de PT sont comprises entre 53,5 et 61,3, autrement dit toutes sont comprises dans les valeurs usuelles, avec une moyenne de 57,0 (écart-type = 2,2).

Pour les 13 chiens dont on a pu calculer la différence T-T0, on constate une diminution moyenne de PT de -4,6 (écart-type = 9,1), soit environ 7% de la valeur initiale. Cette différence n'est pas significative au seuil de 5%. Sur les 13 chiens, 4 d'entre eux ont montré une augmentation des PT après effort : les chiens 4, 14, 16, et 17 avec des augmentations respectives de 1,5 ; 2,2 ; 4,2 ; et 7,8.

Les valeurs données précédemment ainsi que les intervalles de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 22 suivant :

Tableau 22. Valeurs de PT avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. La diminution de PT n'est pas significative au seuil de 5%. n: nombre d'observations. VU : valeurs usuelles.

PT en g/L	**T0**	**T**	**Différence T-T0**	**Degré de signification**
Moyenne (écart-type)	**62,1** (9,6)	**57,0** (2,2)	**-4,6** (0,80)	p>0,05
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*57,2 – 67,2*	*55,9 – 58,0*	*-9,4 – -0,1*	
minimum	45,7	53,5	-25,4	
maximum	83,0	61,3	7,8	
n	*13*	*16*	*13*	

L'effort de sprint a donc été responsable d'une diminution non significative de PT.

b) *Paraoxonase-1 (PON)*

Les valeurs de l'activité de la PON sont exprimées en UI/L.

Les distributions des valeurs de la PON avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 30 qui suit :

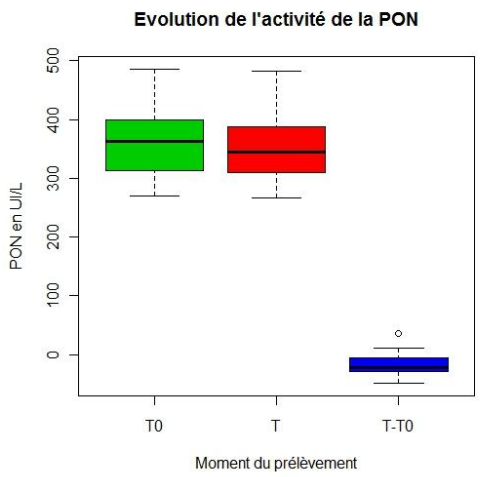


Figure 30. Distributions des valeurs de PON des 16 chiens avant (T0) et après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

Les valeurs des 16 chiens à T0 sont comprises entre 270,7 et 485,7 avec une moyenne de 363,8 (écart-type = 59,1).

Après l'effort de course, à T, les valeurs oscillent entre 267,2 et 482,0, et la moyenne est de 348,0 (écart-type = 59,3).

On observe ainsi après l'effort une baisse moyenne de -15,8 UI/L (écart-type = 21,0) soit environ 4% de la valeur initiale à T0. Cette différence est significative au seuil de 5% (p<0,05). Seuls 3 chiens sur 16 présentent une augmentation de la PON entre T0 et T : les chiens 5, 6 et 17 avec des augmentations respectives de 36,2 ; 10,5 ; et 9,8.

Les valeurs données précédemment ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 23 suivant :

Tableau 23. Valeurs de l'activité de la PON avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. La diminution de la PON est significative au seuil de 5%. n: nombre d'observations.

PON en UI/L	T0	T	Différence T-T0	Degré de signification
Moyenne (écart-type)	**363,8** (59,1)	**348,0** (59,3)	**-15,8** (21,0)	p<0,05
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*336,7 – 393,6*	*321,5 – 374,4*	*-24,8 – -5,2*	
minimum	270,7	267,2	-48,3	
maximum	485,7	482,0	36,2	
n	*16*	*16*	*16*	

L'effort de sprint a donc été responsable d'une diminution significative de l'activité de la PON, d'environ 4% de la valeur initiale.

c) *Fluidité membranaire des érythrocytes (inverse de Tc)*

La fluidité membranaire des érythrocytes est évaluée à partir du temps de corrélation-relaxation Tc : elle est inversement proportionnelle à Tc. Tc est exprimé en nanosecondes.

Les distributions des valeurs de Tc avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 31 qui suit :

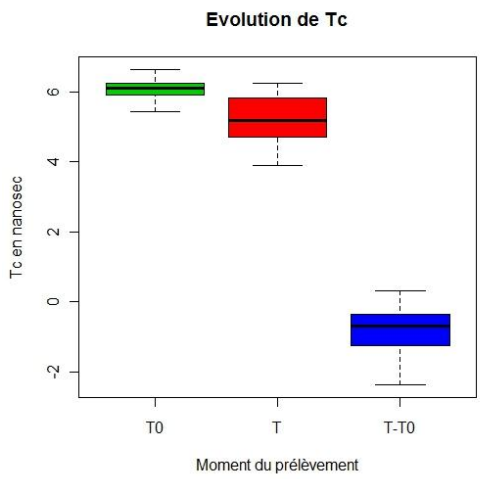


Figure 31. Distributions des valeurs de Tc des 16 chiens avant (T0) et après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

A T0 les valeurs des 16 chiens s'échelonnent entre 5,43 et 6,63, la moyenne étant de 6,07 (écart-type = 0,32).

Après l'effort, à T, Tc varient entre 3,90 et 6,25, pour une moyenne de 5,18.

L'effort a ainsi été responsable d'une baisse moyenne de -0,89 (écart-type = 0,77) soit environ 13% de la valeur initiale. Cette différence est significative au seuil de 1‰ ($p < 0,001$). Sur les 16 chiens, un seul a montré une augmentation de Tc entre T0 et T : il s'agit du chien 5 avec une augmentation de 0,33.

Les valeurs données précédemment ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 24 suivant :

Tableau 24. Valeurs de Tc avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. La diminution de Tc est significative au seuil de 1‰. n: nombre d'observations.

Tc en nanosec	T0	T	Différence T-T0	Degré de signification
Moyenne (écart-type)	**6,07** (0,32)	**5,18** (0,69)	**-0,89** (0,77)	p<0,001
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*5,92 – 6,22*	*4,88 – 5,50*	*-1,25 – -0,52*	
minimum	5,43	3,90	-2,36	
maximum	6,63	6,25	0,33	
n	*16*	*16*	*16*	

L'effort de sprint a donc été responsable d'une diminution très significative de Tc, d'environ 13% de la valeur initiale, autrement dit d'une augmentation très significative de la fluidité membranaire des érythrocytes.

d) *Dommages musculaires : Créatine Kinase (CK) et Aspartate Amino Transférase (AsAT)*

L'activité de ces 2 enzymes est exprimée en UI/L.

(1) AsAT

Les distributions des valeurs des AsAT avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 32 qui suit :

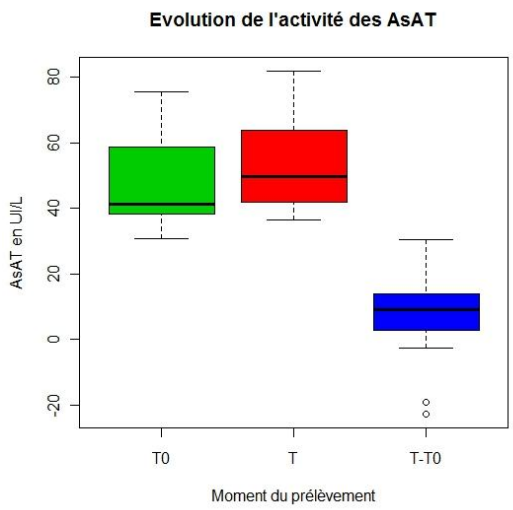


Figure 32. Distributions des valeurs d'AsAT de 13 chiens avant (T0) et 16 chiens après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

Les AsAT des 13 chiens retenus, à T0, sont comprises entre 30,9 et 75,4 pour une moyenne de 47,2 (écart-type = 14,5). L'intervalle des valeurs usuelles données par Willard et Tvedten (2004) est de 10 – 62. Sur ces 13 chiens, 2 d'entre eux présentaient des valeurs sortant de cet intervalle : les chiens 5 et 7 avec respectivement 75,4 et 65,9.

Après la course, à T, les 16 prélèvements ont pu être dosés. Les valeurs sont comprises entre 36,4 et 81,8, pour une moyenne de 53,2 (écart-type = 14,2). 4 chiens sur les 16 se trouvent en dehors des valeurs usuelles : les chiens 13, 14, 16 et 17 avec respectivement 81,8 ; 67,0 ; 74,4 ; et 71,7.

Sur les 13 chiens dont on peut mesurer la différence T-T0, l'effort de sprint a donc été responsable d'une augmentation moyenne de 6,7 des AsAT, soit environ 14% de la valeur initiale. Cette différence n'est pas significative au seuil de 5% (p>0,05). Sur ces 13 chiens seuls 3 ont vu leurs AsAT baisser après l'effort : les chiens 3, 5 et 7 avec respectivement -2,6 ; -22,6 ; et -19,1.

Les valeurs données précédemment ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 25 suivant :

Tableau 25. Valeurs de l'activité des AsAT avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. L'augmentation des AsAT n'est pas significative au seuil de 5%. n: nombre d'observations. VU : valeurs usuelles.

AsAT en UI/L	**T0**	**T**	**Différence T-T0**	**Degré de signification**
Moyenne (écart-type)	**47,2** (14,5)	**53,2** (14,2)	**6 ,7** (14,8)	p>0,05
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*40,0 – 55,0*	*46,4 – 60,4*	*-1,3 – 14,1*	
minimum	30,9	36,4	-22,6	
maximum	75,4	81,8	30,5	
n	*13*	*16*	*13*	

L'effort de sprint a donc entrainé une augmentation des AsAT non significative au seuil de 5%.

(2) CK

Les distributions des valeurs de CK avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 33 qui suit :

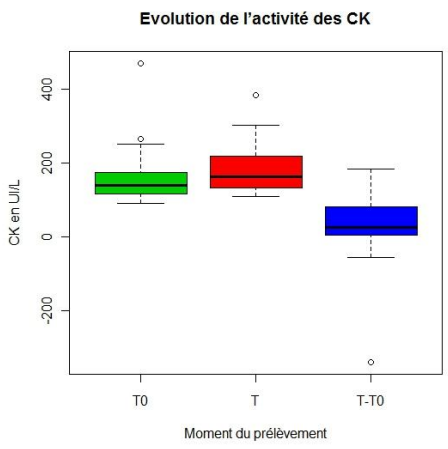


Figure 33. Distributions des valeurs de CK de 13 chiens avant (T0) et 16 chiens après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

A T0 sur les 13 chiens retenus, les valeurs de CK s'échelonnent de 90,2 à 468,6 avec une moyenne de 175,3 (écart-type = 103,1). Les valeurs usuelles données par Willard et Tvedten (2004) sont 51 – 529, et les valeurs mesurées chez les 13 chiens retenus appartiennent à cet intervalle.

A T, après la course, les 16 prélèvements ont pu être dosés. Les valeurs varient alors de 108,9 à 383,5, pour une moyenne de 187,9 (écart-type = 75,5). L'ensemble des 16 chiens ont des valeurs de CK comprises dans l'intervalle des valeurs usuelles.

Pour les 13 chiens où la différence T- T0 a pu être calculée, on observe une augmentation moyenne des CK après la course de 20,7 (écart-type = 123,7), ce qui représente environ 12% de la valeur initiale. Cette différence n'est pas significative au seuil de 5% (p>0,05). Sur ces 13 chiens seuls 2 ont vu leur CK baisser après l'effort : les chiens 5 et 7 avec des baisses respectives de -54,6 et -337,9.

Les valeurs données précédemment ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 26 suivant :

Tableau 26. Valeurs de l'activité des CK avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. L'augmentation des CK n'est pas significative au seuil de 5%. n: nombre d'observations. VU : valeurs usuelles.

CK en UI/L	**T0**	**T**	**Différence T-T0**	**Degré de signification**
Moyenne (écart-type)	**175,3** (103,1)	**187,9** (75,5)	**20,7** (123,7)	p>0,05
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*130,6 – 232,5*	*156,3 – 225,9*	*-52,2 – 73,4*	
minimum	90,2	108,9	-337,9	
maximum	468 ,6	383,5	183,8	
n	*13*	*16*	*13*	

L'effort de sprint a donc entrainé une augmentation des CK non significative au seuil de 5%.

e) *Malondialdéhyde (MDA)*

Les valeurs de la concentration en MDA sont exprimées en µmol/L.

A T0, seulement 8 prélèvements sur 16 ont pu être analysés, les 8 autres ayant subi une hémolyse qui a faussé le dosage avec la technique utilisée.

Les distributions des valeurs de MDA avant (T0) et après (T) effort ainsi que la différence (T-T0) sont représentées dans la Figure 34 qui suit :

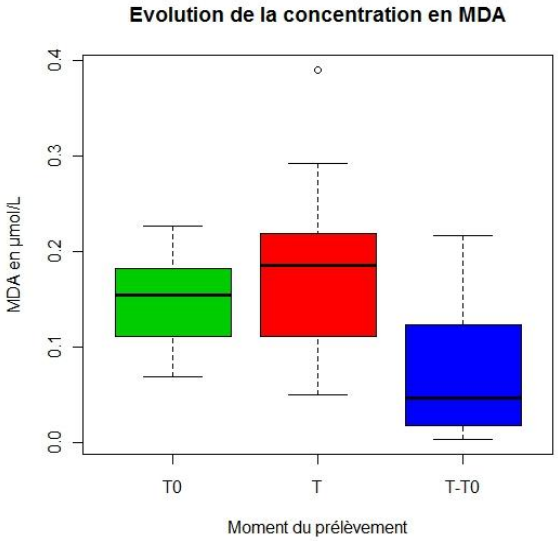


Figure 34. Distributions des valeurs de MDA de 8 chiens avant (T0) et 16 chiens après (T) effort, ainsi que la différence (T-T0).

Les valeurs des 8 chiens à T0 sont comprises entre 0,069 et 0,227 avec une moyenne de 0,149 (écart-type = 0,051).

Après l'effort de course, à T, les valeurs des 16 chiens oscillent entre 0,050 et 0,390 et la moyenne est de 0,178 (écart-type = 0,087).

Pour les 8 chiens dont on a pu mesurer la différence, on observe après l'effort une augmentation moyenne de 0,075 µmol/L (écart-type = 0,074) soit environ 50% de la valeur initiale à T0. Cette différence est significative au seuil de 1% ($p<0,01$). Aucun des 8 chiens ne présente une diminution de MDA entre T0 et T.

Les valeurs données précédemment ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne sont récapitulées dans le Tableau 27 suivant :

Tableau 27. Valeurs de la concentration en MDA avant (T0) et après (T) une course de sprint. Les valeurs sont données en moyenne ± écart-type, ainsi que l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne et la fourchette des valeurs. L'augmentation de MDA est significative au seuil de 1%. n: nombre d'observations.

MDA en µmol/L	T0	T	Différence T-T0	Degré de signification
Moyenne (écart-type)	**0,149** (0,051)	**0,178** (0,087)	**0,075** (0,074)	p<0,01
Intervalle de confiance à 95% sur la moyenne	*0,117 – 0,182*	*0,138 – 0,218*	*0,028 – 0,126*	
minimum	0,069	0,050	0,004	
maximum	0,227	0,390	0,217	
N	*8*	*16*	*8*	

L'effort de sprint a donc été responsable d'une augmentation très significative de la concentration en MDA, d'environ 50% de la valeur initiale.

3. Effet de l'attelage

A T0 il n'y a pas d'influence de la nature de l'attelage sur les paramètres PT, CK, AsAT et Tc au seuil de 5%. Par contre il y a une différence significative (p<0,05) de la valeur de la PON en fonction de l'attelage. Les moyennes de la PON sont par ordre croissant: CLC : 305,0 ; TLC : 349,5 ; LK : 376,8 ; PS : 424,1. La Figure 35 suivante représente les valeurs de PON des 4 chiens de chaque attelage, avec la moyenne de l'attelage :

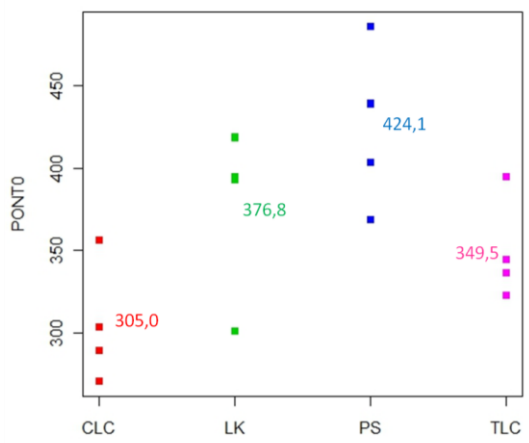


Figure 35. Représentation de la valeur de PON à T0 des 16 chiens en fonction de leur attelage, ainsi que la moyenne de l'attelage. La différence globale est significative au seuil de 5% (p<0,05). TLC : attelage de Thierry LO CASCIO ; CLC : attelage de Christophe LO CASCIO, LK : attelage de Ludovic KUPEZAK ; PS : attelage de Philip SANGLA.

A T il n'y a pas d'influence de l'attelage sur les paramètres PT, CK, MDA, PON et Tc au seuil de 5%. Par contre il y a une différence significative (p<0,05) de la valeur des AsAT en fonction de l'attelage. Les moyennes des AsAT sont par ordre croissant: TLC : 40,1 ; CLC : 47,4 ; LK : 51,6 ; PS : 73,7. La Figure 36 suivante représente les valeurs des AsAT des 4 chiens de chaque attelage, avec la moyenne de l'attelage.

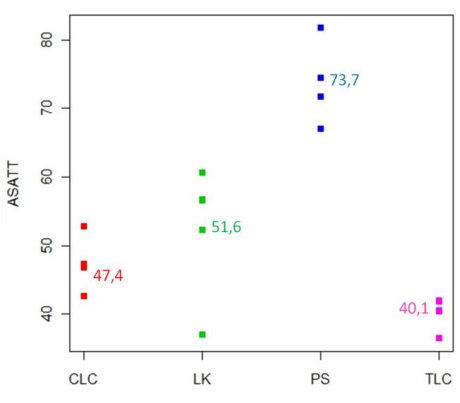


Figure 36. Représentation de la valeur des AsAT à T des 16 chiens en fonction de leur attelage, ainsi que la moyenne de l'attelage. La différence globale est significative au seuil de 5% (p<0,05). TLC : attelage de Thierry LO CASCIO ; CLC : attelage de Christophe LO CASCIO, LK : attelage de Ludovic KUPEZAK ; PS : attelage de Philip SANGLA.

Il y a donc un effet significatif au seuil de 5% de la nature de l'attelage sur la valeur de la PON avant la course, et des AsAT après la course.

4. Effet de l'âge des chiens

A T0, il n'y a pas de différence significative dans les valeurs de PT, AsAT, CK, PON et Tc selon les 3 classes d'âge des chiens.

A T, il n'y a pas non plus de différence significative pour PT, AsAT, CK et PON. Il y a par contre une différence globale significative au seuil de 5% pour les valeurs de PON et de Tc selon la classe d'âge. Les moyennes de PON des 3 classes d'âge sont par ordre croissant : V : 0,075 ; J : 0,184 ; A : 0,230, et celles de Tc sont: J : 4,93 ; A : 5,06 ; V : 6,05.

La Figure 37 suivante représente les valeurs de MDA des chiens en fonction de la classe d'âge, avec la moyenne et l'effectif de chaque classe :

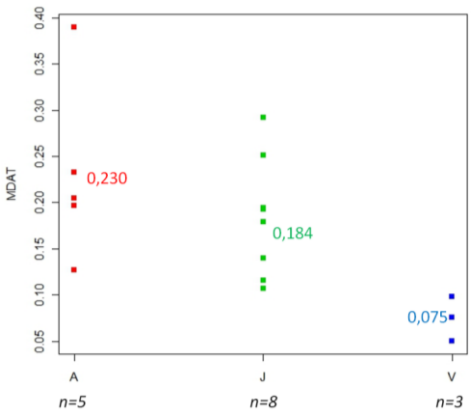


Figure 37. Représentation de la valeur de MDA à T des 16 chiens en fonction de leur classe d'âge, ainsi que la moyenne de chaque classe. La différence globale est significative au seuil de 5% (p<0,05). Classe d'âge : J pour les jeunes chiens jusqu'à 3 ans inclus ; A pour les adultes de 3 à 6 ans inclus ; V pour les plus vieux chiens de plus de 6 ans. n : nombre d'échantillons de chaque classe.

La Figure 38 suivante représente les valeurs de Tc des chiens en fonction de la classe d'âge, avec la moyenne et l'effectif de chaque classe :

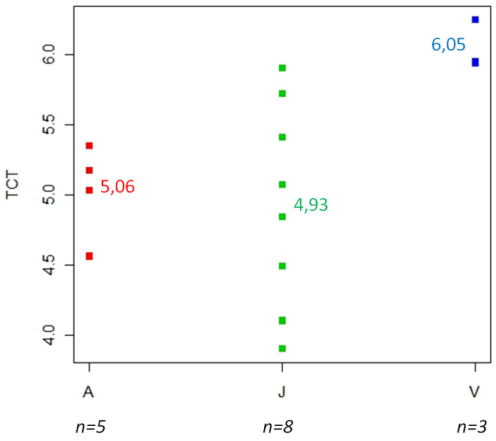


Figure 38. Représentation de la valeur de Tc à T des 16 chiens en fonction de leur classe d'âge, ainsi que la moyenne de chaque classe. La différence globale est significative au seuil de 5% (p<0,05). Classe d'âge : J pour les jeunes chiens jusqu'à 3 ans inclus ; A pour les adultes de 3 à 6 ans inclus ; V pour les plus vieux chiens de plus de 6 ans. n : nombre d'échantillons de chaque classe.

Il y a donc un effet significatif au seuil de 5% de la classe d'âge des chiens sur la valeur de MDA et de Tc après la course.

5. Effet du sexe des chiens

A T0, il n'y a pas de différence significative dans les valeurs de PT, PON et Tc selon le sexe des chiens. Par contre il y une différence significative pour les CK et les AsAT. Les moyennes pour le groupe des femelles sont moins élevées pour les 2 enzymes que celles du groupe des mâles :

- pour les 3 femelles : AsAT : 34,3 ; CK : 105,1,
- et pour les 10 mâles : AsAT : 51,1 ; CK : 196,4.

Cette différence significative est élevée puisque AsATmâles/AsAT femelles = 49% et CKmâles/ CKfemelles = 87%.

A T, il n'y aucune différence significative pour PT, AsAT, CK, MDA, PON, Tc.

La Figure 39 et la Figure 40 suivantes représentent respectivement les valeurs des AsAT et des CK à T0 de chaque chien selon leur sexe, avec la moyenne de chaque groupe et l'effectif correspondant :

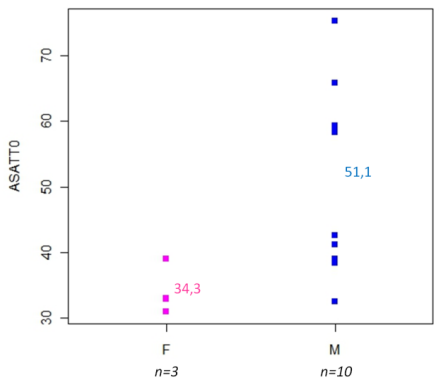


Figure 39. Représentation de la valeur des AsAT à T0 de 13 chiens en fonction de leur sexe, ainsi que la moyenne de chaque groupe. La différence est significative au seuil de 5% (p<0,05). F : femelles ; M : mâles. .n : nombre d'échantillons de chaque groupe.

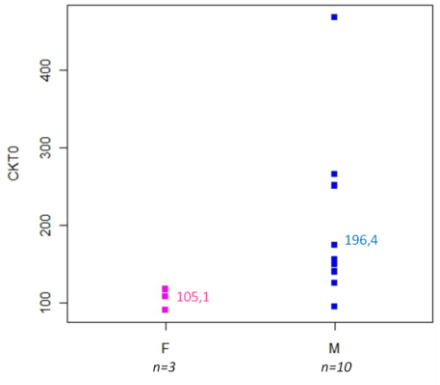


Figure 40. Représentation de la valeur des CK à T0 de 13 chiens en fonction de leur sexe, ainsi que la moyenne de chaque groupe. La différence est significative au seuil de 5% (p<0,05). F : femelles ; M : mâles. .n : nombre d'échantillons de chaque groupe.

Il y a donc un effet significatif au seuil de 5% du sexe des chiens sur la valeur des enzymes musculaires AsAT et CK avant la course.

6. Corrélation linéaire entre les paramètres, et régression orthogonale.

La corrélation a été recherchée à T0 et à T, entre les marqueurs suivants : CK, AsAT, MDA, PON et Tc ; le MDA n'a pas été conservé à T0 car l'effectif était trop faible (8 chiens sur 16).

La recherche d'une corrélation linéaire entre les différents paramètres passe tout d'abord par l'examen des diagrammes de dispersion des paramètres pris 2 à 2. La Figure 41 et la Figure 42 suivantes représentent l'ensemble de ces diagrammes de dispersion, à T0 et à T :

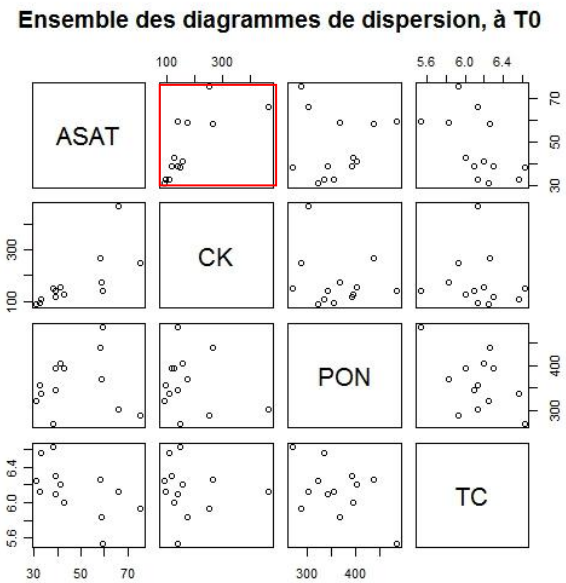


Figure 41. Représentation des diagrammes de dispersion des variables prises 2 à 2, avant la course. AsAT : Aspartate Amino-Transférase ; CK : Créatine Kinase ; PON : Paraoxonase ; MDA : Malondialdéhyde ; Tc : temps de corrélation-relaxation. En rouge : diagramme évoquant une corrélation linéaire.

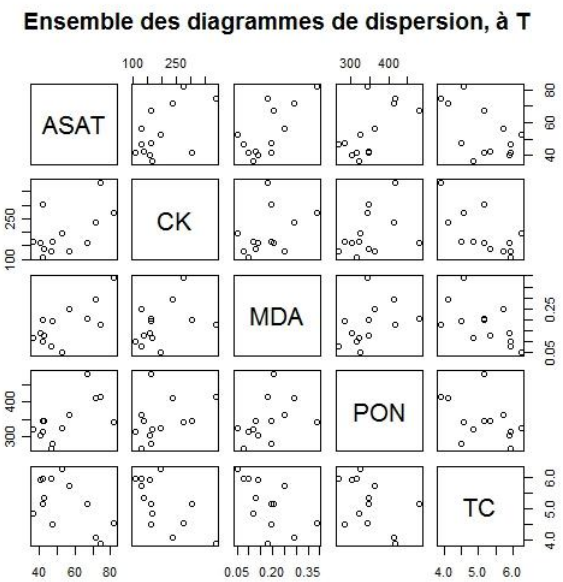


Figure 42. Représentation des diagrammes de dispersion des variables prises 2 à 2, après la course. AsAT : Aspartate Amino-Transférase ; CK : Créatine Kinase ; PON : Paraoxonase ; MDA : Malondialdéhyde ; Tc : temps de corrélation-relaxation.

On se rend compte ainsi que les diagrammes ne représentent pas de corrélation, ni linéaire ni même exponentielle, excepté celui entre AsAT et CK à T0 qui évoque une corrélation linéaire.

Le calcul des coefficients de Spearman confirment cette tendance puisque seul le coefficient entre AsAT et CK à T0 est supérieur à 0,703 (soit $p<0,01$) soit égal à 0,831. La corrélation linéaire est donc très significative avant la course entre CK et AsAT.

A l'aide d'une régression orthogonale nous obtenons l'équation suivante à T0 : CK = 9,7 * AsAT – 282,1.

En résumé, notre étude nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Aucun chien n'a été sujet à des dommages musculaires majeurs au regard la biologie, et leur état d'hydratation est correct.
- L'effort de sprint a entrainé de manière significative une augmentation des produits d'oxydation des lipides membranaires (MDA), une diminution de l'activité de la PON et une augmentation de la fluidité membranaire (= diminution de Tc) immédiatement après l'effort ; de manière non significative nous avons observé que l'effort a tendance à faire diminuer la protéinémie, et augmenter l'activité plasmatique des enzymes musculaires CK et AsAT.
- Les valeurs de l'activité de PON avant la course, et des AsAT après la course diffèrent selon les attelages.
- L'âge des chiens a influencé la fluidité membranaire et le MDA après l'effort. Par ordre décroissant de fluidité membranaire : jeunes > adultes > vieux chiens (évolution inverse de Tc). Pour le MDA l'ordre chronologique n'est pas retrouvé, puisque par ordre croissant de MDA : vieux chiens > jeunes > adultes.
- L'activité plasmatique des enzymes musculaires CK et AsAT avant la course est plus élevée chez les mâles que chez les femelles.
- Les CK et AsAT ont montré une corrélation significative avant la course.
- Les valeurs de PON et de Tc sont concordants entres les prélèvements hémolysés et ceux non hémolysés.
- Le MDA est un marqueur très fragile et labile, mais qui s'avère très intéressant lorsqu'il est dosable.

Nous allons confronter ces résultats avec ceux trouvés dans des études antérieures chez le chien et chez d'autres espèces (homme, cheval, animal de laboratoire).

C. Discussion

1. Effet de l'effort de sprint

Concernant la protéinémie (PT) avant la course, on s'aperçoit que la majorité des chiens étaient correctement hydratés, puisque les valeurs étaient comprises dans les valeurs usuelles, sauf 2

d'entre eux : le chien 5 à T0 était en hyperprotéinémie, ce qui traduit une déshydratation modérée avant le début de la course ; le chien 17 à T0 était en hypoprotéinémie. Compte tenu de la technicité et du niveau des mushers, nous pouvons écarter le déséquilibre alimentaire comme cause de cette hypoprotéinémie. Chez le lévrier de course, McKeever et al. (1985) ont montré que l'entrainement induit une hypervolémie qui se manifeste par une baisse de la protéinémie de base. Cela constitue une adaptation à l'effort. Il est alors raisonnable de penser que l'hypoprotéinémie de ce chien s'explique par une hypervolémie induite par son entrainement, éventuellement associée à des pertes digestives et/ou rénales et un catabolisme accrus par la succession des étapes du DRA.

Nous n'avons toutefois pas pu mettre en évidence d'évolution significative de la protéinémie suite à l'effort de sprint : pour une majorité de chiens (9/13) la protéinémie a diminué après l'effort, alors que pour les autres (4/13) elle a augmenté. Lors des courses de sprint de lévriers l'effort a été responsable d'une augmentation immédiate de la protéinémie (Ilkiw, Davis et al. 1989; Rose and Bloomberg 1989; Marshall, Scott et al. 2002). Cette évolution serait due en grande partie à un passage de liquide intravasculaire dans le secteur extravasculaire extracellulaire (Ilkiw, Davis et al. 1989), et à une perte hydrique par polypnée thermique. Ilkiw et al. (1989) ont également montré que la protéinémie se re-normalise au cours de la période de récupération (3h après effort). Lors d'une épreuve d'agility, Rovira et al. (2007) n'ont pas mis en évidence de variation de la protéinémie ; l'hémoconcentration suggérée par l'augmentation de l'hématocrite serait due dans ce cas-là à une splénocontraction. Enfin lors de courses de traineau de très longues distances, la protéinémie des chiens décroit significativement au fur et à mesure de l'avancement de la course (Hinchcliff, Reinhart et al. 1997; Hinchcliff, Shaw et al. 1998; McKenzie, Jose-Cunilleras et al. 2007): cette baisse serait due comme pour l'entrainement (voir plus haut) essentiellement à une augmentation de la volémie (Hinchcliff, Reinhart et al. 1997), qui représente une adaptation à l'effort endurant.

Au cours de notre étude il semblerait donc que certains chiens subissent une déshydratation à l'instar des lévriers de course, alors que d'autres présentent une hypervolémie à l'instar des chiens de traineau de longues distances.

Le suivi de la protéinémie nous a également permis de nous assurer que les valeurs des paramètres dosés n'ont pas été faussées par une hémoconcentration ou par une hémodilution.

<u>Concernant la PON</u>, on s'aperçoit que l'effort de sprint a entrainé une baisse significative de son activité, d'environ 4% : cela traduit la présence d'EOR induites par l'effort qui ont inhibé l'activité enzymatique de la paraoxonase-1. Cette diminution de la PON induite par un effort a été retrouvée chez le chien par Motta et al. (2009) sur des Beagles non entrainés effectuant un effort sur tapis roulant et par Thiébault et al. (2010, unpublished data) selon le même protocole mais sur des Beagles entrainés, ainsi que chez l'homme par Tsakiris et al. (2009) chez des basketteurs entrainés et par Tomas et al. (2002) chez de jeunes hommes non entrainés. Cette diminution a d'ailleurs pu être supprimée à la suite d'une période de supplémentation en vitamine E (Motta, Letellier et al. 2009; Tsakiris, Karikas et al. 2009), et a pu être atténuée après une période d'entrainement de 45j (Thiébault, Motta et al. 2010, unpublished data).

<u>Concernant la fluidité membranaire des érythrocytes</u> évaluée par RPE, on constate que l'effort de sprint a été responsable d'une augmentation significative de la fluidité (baisse significative de Tc d'environ 13%). Cela peut paraitre surprenant et paradoxal par rapport aux résultats des travaux de Motta et al. (2009), de Berzosa et al. (2010), et de Portier et al. (2006), qui ont montré

respectivement chez le chien, l'homme, et le cheval non entrainés une diminution de la fluidité membranaire après effort, par altération oxydative des lipides membranaires.

Or il est important de considérer le statut sportif des sujets étudiés : en effet d'autres études ont porté sur l'impact d'un exercice régulier sur la fluidité membranaire. Celle-ci est plus élevée chez des marathoniens et sprinteurs, et chez des footballeurs professionnels que chez des hommes sédentaires (Kamada, Tokuda et al. 1993), (Cazzola, Russo-Volpe et al. 2003) , et la pratique d'un entrainement aérobie régulier augmente cette fluidité chez l'homme (Tsuda, Yoshikawa et al. 2003). D'ailleurs dans une étude non publiée, Thiébault et al. (2010, unpublished data) ont montré que 45j d'entrainement régulier chez des Beagles ont permis de supprimer la baisse de la fluidité après effort (Tc constant entre avant l'effort et après l'effort). Enfin, très récemment au cours d'un travail de thèse portant sur l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin au cours d'un trophée à étapes, Tisssier (2011) a montré que la fluidité membranaire avait tendance à augmenter après un effort de course, alors qu'elle diminuait progressivement entre le 1er et le dernier jour de l'épreuve.

Ainsi nos résultats, comme ceux des études antérieures, tendent à montrer que l'effort intense peut être responsable de dommages oxydatifs chez un sujet n'ayant pas un niveau d'entrainement suffisant par rapport à l'effort fourni. Par contre l'entrainement régulier d'un sujet permet une amélioration des capacités antioxydantes, se traduisant en outre par une augmentation de la fluidité membranaire érythrocytaire après l'effort.

Concernant les dommages musculaires : ils se traduisent biologiquement par une majoration des paramètres AsAT et CK. Compte-tenu de leur demi-vie chez le chien (6h pour les CK, 50h pour les AsAT (Burr, Reinhart et al. 1997)), les CK reflètent plutôt une atteinte musculaire récente alors que les AsAT sont le témoin d'une atteinte ancienne. Pour ce qui est des CK, l'ensemble des chiens de notre étude présentent des valeurs normales, ce qui témoigne de leur bonne tolérance à l'enchainement de plusieurs courses grâce à un bon entrainement. Pour ce qui est des AsAT, quelques chiens ont des valeurs supérieures aux valeurs usuelles, soit avant la course (2/13) soit après la course (4/16). Toutefois cette majoration est faible, et ne révèle pas d'anomalie majeure, d'autant que ce marqueur manque de spécificité : on trouve ces enzymes dans le muscle et également dans le foie (Burr, Reinhart et al. 1997).

L'évolution des CK et des AsAT après l'effort de sprint n'est pas significative, mais la tendance est quand même à une augmentation de ces 2 paramètres. L'augmentation plasmatique des enzymes musculaires a été retrouvé dans de nombreuses études: chez le chien de traineau en courses de sprint (Ready and Morgan 1984; Querengaesser, Iben et al. 1994; Dunlap, Reynolds et al. 2006), en course de moyenne distance (Piercy, K. et al. 2000) et en courses de très longue distance (Burr, Reinhart et al. 1997; Hinchcliff, Shaw et al. 1998; Piercy, K. et al. 2001; McKenzie, Jose-Cunilleras et al. 2007), et chez le lévrier de sprint (Ilkiw, Davis et al. 1989; Marshall, Scott et al. 2002). La majorité des auteurs s'accordent pour dire que l'augmentation des CK et AsAT est liée à des dommages musculaires dus à l'effort produit. Cette augmentation a été moins importante chez des chiens supplémentés en antioxydant que chez des chiens sans supplémentation (Dunlap, Reynolds et al. 2006). Toutefois certains auteurs suggèrent que cette augmentation n'est pas nécessairement due à des dommages musculaires, mais peut être causée par une modification réversible de la perméabilité des cellulaires musculaires lors d'un exercice (Burr, Reinhart et al. 1997). Par ailleurs Hinchliff et al. (1998) et McKenzie et al. (2007) ont constaté que lors de très longues épreuves, les CK

et AsAT commencent par augmenter, puis elles diminuent. Cela correspondrait à une adaptation du muscle à l'effort endurant. Enfin, lors d'un effort assez bref d'agility, Rovira et al. (2007) n'ont pas mis en évidence de variation des CK ni des AsAT : ils expliquent ainsi que soit l'effort n'a pas entrainé de dommages musculaires, soit que ces dommages n'ont pas été détectés à cause du pic de CK qui n'intervient que 6-8h après l'exercice alors que les prises de sang on été effectuées 30min après la fin de l'épreuve.

Concernant les produits d'oxydation des lipides membranaires évalués par le MDA, nous constatons que l'effort de sprint a été responsable d'une augmentation significative. Ces résultats ont déjà été retrouvés dans d'autres espèces : chez l'homme pour des individus entraînés ou non entraînés (Rodriguez, Rosenfeld et al. 2003), (Ramel, Wagner et al. 2004), (Lekhi, Gupta et al. 2007), (Shing, Peake et al. 2007), (Bloomer and Fisher-Wellman 2008), (El Abed, Rebai et al. 2011), chez le chien aussi bien sédentaire (Motta, Letellier et al. 2009) qu'entraîné (Thiébault, Motta et al. 2010, unpublished data), ainsi que chez le cheval (Chiaradia, Avellini et al. 1998). Seifi-Skishahr et al. (2008) ont comparé 2 exercices d'intensité différente chez des hommes sédentaires, et ont obtenu une augmentation significative du MDA post exercice lors d'effort intense mais pas lors d'effort modéré. Quelques études chez l'homme n'ont toutefois pas permis de mettre en évidence de variation significative du MDA après un exercice (Bloomer, Goldfarb et al. 2005), quelque soit le niveau d'entrainement (Dixon, Robertson et al. 2006). Il est alors important de tenir compte du moment du prélèvement sanguin : Rodriguez et al. (2003) avaient montré que le MDA avait bien augmenté 1 min après effort, mais était revenu dans les valeurs usuelles 3 min après ce même effort.

Notre étude ne nous a pas permis d'étudier les effets d'une supplémentation en antioxydant ou de l'entrainement sur ce marqueur du stress oxydant : chez le chien il semblerait que la supplémentation en vitamine E réduise les dommages oxydatifs (Motta, Letellier et al. 2009), (Thiébault, Motta et al. 2010, unpublished data), tout comme un entrainement bien conduit (Thiébault, Motta et al. 2010, unpublished data). Chez l'homme, l'entrainement a déjà montré qu'il permettait d'atténuer le MDA basal (Bloomer and Fisher-Wellman 2008), (Bloomer and Smith 2009), (Leelarungrayub, Saidee et al. 2011) ou l'augmentation de MDA induite par l'exercice (Shing, Peake et al. 2007).

Ainsi il est tout à fait intéressant de constater que les chiens de notre étude possèdent un niveau d'entrainement qui leur permet d'effectuer plusieurs courses sans présenter d'atteinte musculaire, que l'effort a tendance à entrainer une augmentation des enzymes musculaires dont le mécanisme reste à préciser (dommages musculaires, ou augmentation de la perméabilité musculaire), et que le suivi des CK lors d'une courte épreuve peut être masquée par le pic qui n'intervient que 6 à 8h plus tard.

2. Effet de l'attelage

Peu de paramètres ont été influencés de manière significative par la nature de l'attelage : il y a toutefois la PON avant la course (T0), dont la moyenne est significativement différente selon l'attelage considéré.

On s'aperçoit que la valeur moyenne de PON à T0 est croissante comme suit : CLC < TLC < LK < PS. D'après les études de Thiébault et al. (2010, unpublished data) chez le chien, et de Hamurcu et

al. (2010) et Tomas (2002) chez l'homme, le niveau de PON est influencé par l'entrainement : la PON est significativement plus élevée chez des sujets sportifs que chez des sujets sédentaires. Cela suggère qu'il y a une différence de niveau d'entrainement entre les 4 attelages. Malgré les données fournies par les mushers sur leur modalités d'entrainement, il est délicat de comparer ces 4 types d'entrainement tant il y a de variables (durée, fréquence, nature, période de récupération etc.).

3. Effet de l'âge des chiens

Sur l'ensemble des paramètres, seules les valeurs moyennes de MDA et de Tc après l'effort ont été influencées significativement par l'âge des chiens. Pour Tc on obtient dans l'ordre croissant de Tc : jeunes chiens < adultes < vieux chiens. Autrement dit la fluidité membranaire après l'effort est d'autant plus grande que les chiens sont jeunes. Pour MDA, on trouve dans l'ordre croissant de MDA : vieux chiens < jeunes < adultes. Cela signifie que l'on retrouve moins de produit d'oxydation des lipides membranaires chez les individus plus vieux que chez les jeunes et que chez les adultes.

Ainsi les vieux chiens possèdent une fluidité membranaire faible mais étonnamment moins de produit d'oxydation des lipides membranaires après effort que les jeunes et les adultes. Les jeunes présentent après effort une plus grande fluidité membranaire et moins de produit d'oxydation des lipides membranaires que les adultes.

A notre connaissance aucune autre étude n'a comparé l'effet de l'âge sur ces paramètres chez le chien. Nous pouvons émettre l'hypothèse, à propos de la fluidité membranaire, que plus l'organisme est âgé, toutes choses égales par ailleurs, plus il a subit des attaques oxydatives au cours de sa vie et a ainsi un pool d'antioxydant plus faible et donc une fluidité membranaire érythrocytaire plus faible. Quant au produit d'oxydation des lipides membranaires, l'explication que nous pouvons proposer est que les vieux chiens d'une part ont moins de capacités physiques que les autres dans l'attelage et ainsi produisent moins de déchets d'oxydation, et que les jeunes d'autre part sont moins efficaces car moins expérimentés et réalisent de 'mauvais' efforts. En d'autres termes, les adultes semblent être suffisamment expérimentés et efficaces pour produire un effort conséquent adéquat et minimiser la production de déchets d'oxydation. Cela ne reste qu'une hypothèse puisque nous n'avons pas évalué le degré de participation de chaque chien à l'effort de traîne (nous l'avons supposé égal).

De plus nos résultats ont pu être influencés par d'autres facteurs, comme par exemple la position du chien dans l'attelage (devant ou « lead » vs derrière ou « wheel »).

.

4. Effet du sexe des chiens

Le sexe des chiens a influencé significativement les valeurs moyennes des AsAT et des CK avant la course : les mâles ont en moyenne des valeurs bien plus élevées que les femelles pour les 2 enzymes (49% de plus pour AsAT et 87% pour CK). Selon Querengaesser et al. (1994), les chiens mâles ont en moyenne des valeurs de CK 50% plus élevées que les femelles. Chez la femme, Carter et al. (Carter, Dobridge et al. 2001) ont établi une corrélation négative significative entre la concentration en œstrogènes et l'activité des CK, avant et 3j après un effort : plus il y a d'œstrogènes moins l'activité des CK est élevée. Chez le rat par contre Amelink et al. (1988) n'ont pas mis en évidence de différence significative pour les AsAT et les CK avant effort entre mâles et femelles, mais ils ont obtenu des augmentations après effort significativement plus importantes chez les mâles que

chez les femelles. Dans une synthèse d'études menées chez l'homme et chez le rat, Kendall et Eston (2002) ont rapporté également que l'augmentation des CK induite par l'effort est plus importante chez les mâles que chez les femelles, que les œstrogènes ont des capacités antioxydantes démontrées dans la protection du cœur, et que ceux-ci agissent plutôt sur la stabilisation des membranes cellulaires musculaires plus que sur la diminution des dommages musculaires puisqu'il n'y a aucune différence à l'examen histologique.

Ainsi nos résultats sont en partie en accord avec ceux trouvés dans d'autres espèces : il semblerait que les femelles présentent des mécanismes de protection ou de réparation du muscle plus efficaces que les mâles. Cela serait lié aux œstrogènes qui possèdent des capacités antioxydantes et stabilisatrices des membranes.

5. Corrélation linéaire entre CK et AsAT

A notre connaissance, aucune étude n'a cherché une corrélation entre ces 2 paramètres. La corrélation linéaire significative trouvée dans notre étude confirme que CK et AsAT sont liées et influencées par un paramètre commun (=les dommages musculaires), d'autant qu'un examen biochimique simple nous a permis de constater que les autres enzymes hépatiques, les Alanine Amino-Transférases et les Phosphatases Alcaline, ne présentaient pas d'anomalie (valeurs non publiées).

6. Choix des marqueurs

Les marqueurs utilisés ont été des marqueurs de biologie dosés en routine (PT, AsAT, CK) et des marqueurs très spécifiques du stress oxydant cellulaire (Tc, PON, MDA). Nous avons constaté que l'hémolyse qui a rendu impossible le dosage de la biologie dans 3 des prélèvements n'a pas du tout posé problème pour 2 des paramètres du stress oxydant (PON et Tc) ; en effet ceux-ci étaient tout à fait concordants avec les valeurs des autres chiens. Cela renforce l'intérêt de ces 2 marqueurs puisqu'ils apparaissent plus stables que ceux de la biologie. A l'inverse, le MDA s'avère un marqueur plutôt fragile puisque 8 prélèvements n'ont pas pu être dosés ; quand il a été dosable, nous avons eu des résultats fiables et significatifs.

Il aurait toutefois été intéressant de doser ces mêmes paramètres au tout début du DRA, à l'instar des mesures faites par Tissier (2011) en cross canin, afin d'étudier l'impact de la répétition des étapes jour après jour sur l'organisme canin. Cela n'a pas pu être réalisé pour des raisons de disponibilités.

D. Remerciements

Nous tenons à remercier particulièrement tous les acteurs ayant permis la réalisation de notre étude : Thierry et Christophe LO CASCIO, Ludovic KUPEZAK, et Philip SANGLA (les 4 mushers), ainsi que Comette, Cobra, Excel, Mirny, Jules, Brun, Scoubidou, Jonas, Tiboune, Sonic, Flash, Lilou, Spirou, Bilbon, Fitz, Albus pour les efforts consentis et leurs précieux dons, les organisateurs du DRA et les pisteurs du plateau de Beauregard, le service de biochimie de l'ENVL, et l'encadrant de ce travail le professeur Jean-Jacques THIEBAULT.

CONCLUSION

Le stress oxydant cellulaire se caractérise par la production excessive d'espèces oxydantes dérivées de l'oxygène, dont certaines sont très réactives. La difficulté de son étude réside dans la courte durée de vie des espèces en jeu et dans le fait qu'elles peuvent tout autant assurer des rôles physiologiques au sein de la cellule (signalisation cellulaire, apoptose, lutte antimicrobienne), que se révéler nocives par oxydation des différents composants cellulaires.

Les circonstances d'apparition sont variées : état physiologique, effort, inflammation, hypoxie, etc. Le chien de sport qu'est le chien de traineau est également soumis à un stress oxydant. Le chien de traineau présente en outre diverses particularités physiologiques qui l'y prédisposent : VO_2 max élevée, alimentation hyperlipidique et hyperprotéique, métabolisme musculaire essentiellement oxydatif, travail en altitude, hyperthermie d'effort.

De nombreux travaux indiquent que les chiens réalisant des courses longue distance sont soumis à un stress oxydant significatif. L'absence de publications relatives aux chiens de traineau de sprint nous a conduit à réaliser une étude expérimentale de quelques marqueurs indirects du stress oxydant au cours d'une telle course. Celle-ci nous a permis de confirmer l'intérêt et la pertinence des marqueurs utilisés (PON, fluidité membranaire par RPE) et de mettre en évidence les conséquences de la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène par les chiens suite à l'effort, mais aussi l'adaptation des globules rouges de ces chiens entraînés à la présence des espèces réactives, et l'absence de dommages musculaires majeurs.

La réalisation d'une expérience de terrain a conduit à quelques difficultés : variabilité entre les attelages, conditions climatiques néfastes pour certains prélèvements. Les enjeux futurs consistent à étudier l'évolution de ces marqueurs au cours d'une saison d'entrainement et l'impact d'une complémentation antioxydante pendant cette période ainsi qu'au moment des épreuves.

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 24 NOV. 2011

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F.N GILLY

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acevedo, L. M. and J. L. Rivero (2006). "New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes." Cell Tissue Res **323**(2): 283-303.

Amelink, G. J., H. H. Kamp, et al. (1988). "Creatine kinase isoenzyme profiles after exercise in the rat: sex-linked differences in leakage of CK-MM." Pflugers Arch. **412**(4): 417-421.

Armstrong, R. B., C. W. t. Saubert, et al. (1982). "Distribution of Fiber Types in Locomotory Muscles of Dogs." Am J Anat **163**(1): 87-98.

Arner, E. S. and A. Holmgren (2000). "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem **267**: 6102–6109.

Aviram, M., M. Rosenblat, et al. (1999). "Human serum Paraoxonase (PON-1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants." Free Radical Biology and Medicine **36**(7/8): 892-904.

Aviram, M. B., S.; Sorenson, R.; Bisgaier, C. L.; Newton, and M. E. R S.; Rosenblat, J.; Dunlop, C.; La Du, B. (1998). "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**: 1617-1624.

Baskin, C. R., K. W. Hinchcliff, et al. (2000). "Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercisein sled dogs." Am J Vet Res **61**: 886-891.

Berndt, C., C. H. Lillig, et al. (2007). "Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**: 1227-1236.

Berzosa, C., E. M. Gomez-Trullen, et al. (2010). "Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans." Eur J Appl Physiol **111**(6): 1127-33.

Bigard, X. and N. Simler (2007). Apports Energetiques chez le Sportif. Nutrition du Sportif. E. Masson. Issy-les-Moulineaux**:** 3.

Bloomberg, M. S. (1991). "Spécificités de la pathologie endocrinienne du Greyhound de compétition." Rec Méd Vét **167**(7/8): 787-793.

Bloomer, R. J. and K. H. Fisher-Wellman (2008). "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake." Gend Med **5**(3): 218-28.

Bloomer, R. J., A. H. Goldfarb, et al. (2005). "Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress." J Strength Cond Res **19**(2): 276-85.

Bloomer, R. J. and W. A. Smith (2009). "Oxidative stress in response to aerobic and anaerobic power testing: influence of exercise training and carnitine supplementation." Res Sports Med **17**(1): 1-16.

Brigelius-Flohé, R. (2009). "Commentary: oxidative stress reconsidered." Genes Nutr **4**: 161-163.

Broom, D. M. (1983). "The stress concept and ways of assessing the effects of stress in farm animals. 1, 79." Applied Animal Ethology **11**(1): 79.

Brugère, H. (1991). "Physiopathologie des affections dues au stress chez le chien de sport " Rec Méd Vét **167**(7/8): 635-645.

Burke, R. E., D. N. Levine, et al. (1971). "Mammalian motor Units: physiological-histochemical correlates in three Types in cat gastrocnemius." Science **174**: 709-712.

Burr, J. R., G. A. Reinhart, et al. (1997). "Serum biochemical values in sled dogs before and after competing in long-distance races." J Am Vet Med Assoc **211**(2): 175-9.

Campora, C., K. P. Freeman, et al. (2011). "Determination of haematological reference intervals in healthy adult greyhounds." J Small Anim Pract **52**(6): 301-9.

Carter, A., J. Dobridge, et al. (2001). "Influence of estrogen on markers of muscle tissue damage following eccentric exercise." Fiziol Cheloveka **27**(5): 133-137.

Cazzola, R., S. Russo-Volpe, et al. (2003). "Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls." Eur J Clin Invest **33**(10): 924-30.
Cerretelli, P., J. Piiper, et al. (1964). "Aerobic and Anaerobic Metabolism in exercising Dogs." J Appl Physiol **19**(1): 25-28.
Chiaradia, E., L. Avellini, et al. (1998). "Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **119**(4): 833-6.
Combrisson, H. (1991). "Adaptations cardio-vasculaires et respiratoires à l'exercice chez le chien." Rec Méd Vét **167**(7/8): 649_657.
Cracowski, J.-L., T. Durand, et al. (2002). "Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications." Trends in Pharmacological Sciences **23**(8): 360-366.
Cutler, R. G., J. Plummer, et al. (2005). "Oxidative stress profiling: part II. Theory, technology, and practice." Ann N Y Acad Sci **1055**: 136-158.
Davies, M. J. and C. L. Hawkins (2004). "EPR Spin trapping of protein radicals." Free Radical Biology and Medicine **36**(9): 1072-1086.
Davis, M. S., B. McKiernan, et al. (2002). "Racing Alaskan sled dogs as a model of "ski asthma"." Am J Respir Crit Care Med **166**(6): 878-82.
Deaton, C. M. and D. J. Marlin (2003). "Exercice-associated oxidative stress." Clinical Techniques in Equine Pratice **2**(3): 278-291.
Debuyst, R., B. Gallez, et al. (1999). "Résonance Paramagnétique Electronique (RPE): Principes et Applications Biomédicales." Louvain Méd **118**: 205-213.
Dixon, C. B., R. J. Robertson, et al. (2006). "The effect of acute resistance exercise on serum malondialdehyde in resistance-trained and untrained collegiate men." J Strength Cond Res **20**(3): 693-8.
Donoghue, S., D. S. Kronfeld, et al. (1993). "Intérêt de la supplémentation vitaminique C chez le chien de traineau en situation de course ou de stress." Rec Méd Vét **169**(10): 773-777.
Dosek, A., H. Ohno, et al. (2007). "High altitude and oxidative stress." Respiratory Physiology & Neurobiology **158**(2-3): 128-131.
Dunlap, H. L., A. J. Reynolds, et al. (2006). "Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise." Comp Biochem Physiol **143**: 429-434.
El Abed, K., H. Rebai, et al. (2011). "Antioxidant status and oxidative stress at rest and in response to acute exercise in judokas and sedentary men." J Strength Cond Res **25**(9): 2400-9.
Eldridge, M. W., J. A. Dempsey, et al. (2004). "Exercise-induced intrapulmonary arteriovenous shunting in healthy humans." J Appl Physiol **97**(3): 797-805.
ENVT. (2009). "La thermoregulation." Retrieved 01 oct 11, 2011, from http://physiologie.envt.fr/spip/spip.php?rubrique43.
Erdelmeier, I., D. Gérard-Monnier, et al. (1998). "Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation." Chem Res Toxicol **11**(10): 1184-1194.
Ernster, L. and P. Forsmark-Andree (1993). "Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms." Clin Investig **71**: 60-65.
Evason, M. D., A. P. Carr, et al. (2004). "Alterations in thyroid hormone concentrations in healthy sled dogs before and after athletic conditioning." Am J Vet Res **65**(3): 333-7.
Favier, A. (1997). "Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur " Annales de Biologie Clinique **55**(1): 9-16.
FFPTC. "Fédération Francaise de Pulka et Traîneau à Chiens." Retrieved 01 octobre 2011, from http://www.chiens-de-traineau.com/.
FFST. "Fédération Française des Sports de Traîneau, Ski-Pulka&Joering et Cross-Canins." Retrieved 01 octobre 2011, from http://www.ffstraineau.com/.

Frankel, E. N., J. B. German, et al. (1993a). "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine." The Lancet **341**(8843): 454-457.
Gaughan, K. R. and D. S. Bruyette (2001). "Thyroid function testing in Greyhounds." Am J Vet Res **62**(7): 1130-3.
Gazzola, A., J.-P. Valette, et al. (1984). "Les acides gras libres plasmatiques chez le poney et le chien en effort prolongé." Rec Méd Vét **160**(1): 69-77.
Gerth, N., S. Sum, et al. (2009). "Muscle plasticity of Inuit sled dogs in Greenland." J Exp Biol **212**: 1131-1139.
Gogny, M. and O. Souilem (1995). "Eléments de physiologie de l'effort chez le chien et le cheval." Point Vét **27**(171): 597-605.
Goldberg, M. B., V. A. Langman, et al. (1981). "Panting in dogs: paths of air flow in response to heat and exercise. ." Resp Physiol **43**: 327-338.
Gomez-Cabrera, M.-C., E. Domenech, et al. (2008). "Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training." Free Radical Biology and Medicine **44**(2): 126-131.
Goswami, B., D. Tayal, et al. (2009). "Paraoxonase: a multifaceted biomolecule." Clinica Chimica Acta **410**: 1-12.
Grandjean, D. (1995). "Pathologie du Chien de Sport première partie: les Affections Organiques." Point Vét **27**(171): 607-616.
Grandjean, D. (1997). "Conséquences biologiques et nutritionnelles du travail en haute altitude chez le chien de recherche, Expédition scientifique "Chiens des Cimes - Licancabur 1996"." Rec Méd Vét **172**(11/12): 601-621.
Grandjean, D. (2001). "Le stress oxydatif cellulaire chez le chien: conséquences et prévention nutritionnelle." Bull Acad Vet de France **154**: 49-61.
Grandjean, D. (2005a). "Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien." Le Nouv Prat Vét **22**: 11-15.
Grandjean, D. (2005b). "Le stress oxydatif cellulaire: conséquences physiopathologiques chez le chien." Le Nouv Prat Vet **22**: 22-24.
Grandjean, D., D. S. Kronfeld, et al. (1991). "Alimentation du chien de sport et de travail." Rec Méd Vét **167**(7/8): 727-751.
Grandjean, D. and R. Mateo (1985). Aspects métaboliques de l'exercice musculaire chez le chien. Première Journée de Médecine Sportive Canine, Alfort.
Grandjean, D., N. Moquet, et al. (2002). Guide Pratique du Chien de Sport et d'Utilité. Paris, Royal Canin.
Grandjean, D., N. Renard, et al. (2005c). "L'expédition "Chiens des Cimes 2004"; étude expérimentale." Le Nouv Prat Vét **22**: 41-47.
Grandjean, D., J.-P. Valette, et al. (1993). "Intérêts d'une supplémentation nutritionnelle en L Carnitine, vitamine C, et vitamine B12 chez le chien de sport." Rec Méd Vét **169**(7): 543-551.
Groussard, C., F. Rannou-Bekono, et al. (2003). "Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise." Eur J Appl Physiol **89**(1): 14-20.
Gunn, H. M. (1978). "Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs." J Anat **127**(Pt 3): 615-34.
Gunn, H. M. (1989). "Heart weight and running ability." J Anat **167**: 225-33.
Guy, P. S. and D. H. Snow (1977). "The effect of training and detraining on muscle composition in the horse." J Physiol **269**(1): 33-51.
Guy, P. S. and D. H. Snow (1981). "Skeletal muscle Fibre Composition in the dog and its relationship to athletic ability." Res Vet Sci **31**: 244-248.
Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids." Arch Biochem Biophys **280**: 1-8.
Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (2007). Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University press.

Hammel, E. P., D. S. Kronfeld, et al. (1977). "Metabolic responses to Exhaustive Exercise in racing Sled dogs fed Diets containing medium, low, or zero Carbohydrate." Am J Clin Nutr **30**: 409-418.
Hamurcu, Z., N. Saritas, et al. (2010). "Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys." Pediatr Exerc Sci **22**(1): 60-8.
Harman, D. (1992). Free radical theory of aging: history. Free radicals and aging. B. Verlag. Basel (Suisse)**:** 1-10.
Hill, R. C. (1998). "The Nutritional Requirements of Exercising Dogs." J Nutr **128**: 2686S-2690S.
Hill, R. C., M. S. Bloomberg, et al. (1996). "Energy, fat and performance in greyhounds " J Vet Intern Med **10** 170 (abs.).
Hill, R. C., L. E. Fox, et al. (2001b). "Effects of racing and training on serum thyroid hormone concentrations in racing Greyhounds." Am J Vet Res **62**(12): 1969-72.
Hill, R. C., D. D. Lewis, et al. (2001a). "Effect of increased dietary protein and decreased dietary carbohydrate on performance and body composition in racing Greyhounds." Am J Vet Res **62**(3): 440-447.
Hinchcliff, K., G. A. Reinhart, et al. (2000). "Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise." Am J Vet Res **61**(5): 512-517.
Hinchcliff, K. W., G. A. Reinhart, et al. (1997). "Effect of racing on serum sodium and potassium concentrations and acid-base status of Alaskan sled dogs." J Am Vet Med Assoc **210**(11): 1615-8.
Hinchcliff, K. W., L. C. Shaw, et al. (1998). "Effect of distance traveled and speed of racing on body weight and serum enzyme activity of sled dogs competing in a long-distance race." J Am Vet Med Assoc **213**(5): 639-44.
Hoppeler, H. and M. Flück (2002). "Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity." J Exp Biol **205**(15): 2143-2152.
Horton, H. R., L. A. Moran, et al. (1994). Principes de biochimie. Bruxelles, De Boeck Université.
Iccullag and Iznel (2011). "What is Znoo znoo ?" Journal of Effects of Tentatious' Ariane In Mechanisms of Excitation **05**(07): 2010.
Ilkiw, J. E., P. E. Davis, et al. (1989). "Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise." Am J Vet Res **50**(4): 583-6.
Ingjer, F. (1979). "Effects of Endurance training om Muscle fibre ATP-ase activity, Capillary supply and Mitochondrial content in Man." J Physiol **294**: 419-432.
Jackson, M. J. (2008). "Free radicals generated by contracting muscle: By-products of metabolism or key regulators of muscle function ?" Free Radical Biology and Medicine **44**: 132-141.
Jeejeebhoy, K. N. (1991). "In vivo breath alkane as an index of lipid peroxidation." Free Radical Biology and Medicine **10**(3-4): 191-193.
Jenkins, R. R. (2000). "Exercise and oxidative stress methodology: a critique." Am J Clin Nutr **72(suppl)**: 670-674.
Ji, L. L. (2007). "Antioxidant signaling in skeletal muscle: A brief review." Experimental Gerontology **42**(7): 582-593.
Jones, D. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**: 1865-1879.
Kamada, T., S. Tokuda, et al. (1993). "Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners." J Appl Physiol **74**(1): 354-8.
Kayatekin, B. M., S. Gonenc, et al. (2002). "Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver." Eur J Appl Physiol **87**(2): 141-4.
Keddad, K., P. Thérond, et al. (1996). "Alterations in erythrocyte membrane fluidity and fatty acid composition in glycogen storage disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1315**(1): 61-65.
Kendall, B. and R. Eston (2002). "Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen." Sports Med **32**(2): 103-123.
Kirschvink, N. (2011). "Exercice et bilan oxydatif." Pratique Vétérinaire Equine **43**(170): 31-34.
Kopáni, M., P. Celec, et al. (2006). "Oxidative stress and electron spin resonance." Clinica Chimica Acta **364**(1-2): 61-66.

Krinsky, N. I. (1989). "Antioxidant functions of carotenoids." Free Radical Biology and Medicine **7**(6): 617-635.
Kronfeld, D. S., E. P. Hammel, et al. (1977). "Hematological and metabolic responses to training in racing sled dogs fed diets containing medium, low, or zero carbohydrate." Am J Clin Nutr **30**(3): 419-30.
Kuzon, W. M., Jr., J. D. Rosenblatt, et al. (1989). "A comparative histochemical and morphometric study of canine skeletal muscle." Can J Vet Res **53**(2): 125-32.
Latorre, R., F. Gil, et al. (1993). "Skeletal muscle fibre types in the dog." J Anat **182 (Pt 3)**: 329-37.
Lawler, J. M. and S. R. Demaree (2001). "Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle." Mechanisms of Ageing and Development **122**(3): 291-304.
Lee, J. A., K. W. Hinchcliff, et al. (2004). "Effects of racing and nontraining on plasma thyroid hormone concentrations in sled dogs." J Am Vet Med Assoc **224**(2): 226-31.
Leelarungrayub, D., K. Saidee, et al. (2011). "Six weeks of aerobic dance exercise improves blood oxidative stress status and increases interleukin-2 in previously sedentary women." J Bodyw Mov Ther **15**(3): 355-62.
Lehninger, A. L., D. L. Nelson, et al. (1993). Bioénergétique et Métabolisme (Partie III). Principes de Biochimie. M.-S. Flammarion, Worth Publishers**:** 384-390.
Lekhi, C., P. H. Gupta, et al. (2007). "Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists." Br J Sports Med **41**(10): 691-3.
Liu, Y., J. Liu, et al. (2006). "Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis." Free Radical Biology and Medicine **40**(6): 960-967.
Loft, S., H. E. Poulsen, et al. (1999). "Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **441**(1): 11-19.
Longhurst, J. C., T. I. Musch, et al. (1986). "O2 consumption during exercise in dogs--roles of splenic contraction and alpha-adrenergic vasoconstriction." Am J Physiol **251**(3 Pt 2): H502-9.
Mandelker, L. (2008). Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. Vet Clin : Small Anim Practice. f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants, Elsevier Inc. **38:** 1-30.
Manohar, M. and T. E. Goetz (2005). "Intrapulmonary arteriovenous shunts of >15 µm in diameter probably do not contribute to arterial hypoxemia in maximally exercising Thoroughbred horses." J Appl Physiol **99**(1): 224-229.
Margaria, R., P. Cerretelli, et al. (1963). "Kinetics and mechanism of oxygen debt contraction in man." J Appl Physiol **18**(371).
Marshall, R. J., K. C. Scott, et al. (2002). "Supplemental Vitamin C appears to Slow racing Greyhounds." J Nutr **132**: 1616-1621.
Martarelli, D., M. Cocchioni, et al. (2011). "Cold exposure increases exercise-induced oxidative stress." J Sports Med Phys Fitness **51**(2): 299-304.
Maxwell, L. C., J. K. Barclay, et al. (1977). "Physiological characteristics of skeletal Muscles of dogs and cats." Am J Physiol **233**(1): C14-C18.
McAnulty, S. R., L. McAnulty, et al. (2005). "Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress." Int J Sports Med **26**(3): 188-92.
McArdle, F., S. Spiers, et al. (2004). "Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice." J Physiol **561**: 233-244.
McKeever, K. H., W. A. Schurg, et al. (1985). "Exercise training-induced hypervolemia in greyhounds: role of water intake and renal mechanisms." Am J Physiol **248**(4 Pt 2): R422-5.
McKenzie, E., T. Holbrook, et al. (2005). "Recovery of muscle glycogen concentrations in sled dogs during prolonged exercise." Med Sci Sports Exerc **37**(8): 1307-1312.

McKenzie, E. C., E. Jose-Cunilleras, et al. (2007). "Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise." J Am Vet Med Assoc **230**(10): 1486-92.

McLelland, G., G. Zwingelstein, et al. (1994). "Increased capacity for circulatory fatty acid transport in a highly aerobic mammal." Am J Physiol **266**: R1280-R1286.

McMichael, M. (2007). "Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats." JAVMA **231**(5): 714-720.

Miller, H., B. J. Issekutz, et al. (1963). "Effect of exercise on the metabolism of Fatty acids in the dog." Am J Physiol **205**: 167-172.

Moller, P., H. Wallin, et al. (1996). "Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors." Chemico-Biological Interactions **102**(17-36).

Moquet, N. (2000). 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. IdF, France, ENV Maisons-Alfort. **Doctorat Vétérinaire:** 59.

Motta, S., C. Letellier, et al. (2009). "Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs, assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity." The Veterinary Journal **181**: 288-295.

Musch, T. I., G. C. Haidet, et al. (1985). "Dynamic exercise training in foxhounds; I. Oxygen consumption and hemodynamic responses." J Appl Physiol **59**(1): 183-189.

Niess, A. M. and P. Simon (2007). "Response and adaptation of skeletal muscle to exercise: the role of reactive oxygen species." Front Biosci **1**(12): 4826-38.

NutrientDataLaboratory. (2010). "USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2." Retrieved 01/10/11, 2011, from http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/ORAC/ORAC_R2.pdf.

Packer, L., E. H. Witt, et al. (1995). "Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant." Free Radical Biology and Medicine **19**(2): 227-250.

Panciera, D. L., K. W. Hinchcliff, et al. (2003). "Plasma thyroid hormone concentrations in dogs competing in a long-distance sled dog race." J Vet Intern Med **17**(4): 593-6.

Pasquini, A., E. Luchetti, et al. (2010). "Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise." Res Vet Sci **89**: 120-123.

Paul, P. and B. J. Issekutz (1967). "Role of extramuscular energy sources in the metabolism of the exercising dog." J Appl Physiol **22**(4): 615-622.

Peter, J. B., R. J. Barnard, et al. (1972). "Metabolic profiles of three Fiber Types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits." Biochemistry **11**: 2627-2633.

Pibot, P. (1995). "Les Vétérinaires spécialistes du Chien de Traineau réunis à Reims." L'Action Vétérinaire **1342**.

Piercy, R. J., H. K., et al. (2000). "Effect of dietary supplements containing antioxidants on attenuation of muscle damage in exercising sled dogs." Am J Vet Res **61**(11): 1438-1445.

Piercy, R. J., H. K., et al. (2001). "Vitamin E and exertional rhabdomyolysis during endurance sled dog racing." Neuromuscular Disorders **11**: 278-286.

Pinilla, M., R. E. Shiel, et al. (2009). "Quantitative thyroid scintigraphy in greyhounds suspected of primary hypothyroidism." Vet Radiol Ultrasound **50**(2): 224-9.

Portier, K., B. de Moffarts, et al. (2006). "The effects of dietary N-3 and antioxidant supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses." Equine Vet J Suppl(36): 279-84.

Powers, S. and M. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiol Rev **88**: 1243-1276.

Powers, S. K., D. Criswell, et al. (1994). "Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **266**: 375-380.

Prior, R. L. and G. Cao (1999). "In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods." Free Radical Biology and Medicine **27**(11-12): 1173-1181.

Querengaesser, A., C. Iben, et al. (1994). "Blood changes during training and racing in sled dogs." J Nutr **124**(12 Suppl): 2760S-2764S.
Radak, Z., H. Y. Chung, et al. (2008). "Systemic adaptation to Oxidative Challenge induced by regular Exercise." Free Radical Biology and Medicine **44**: 153-159.
Ramel, A., K. H. Wagner, et al. (2004). "Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men." Eur J Nutr **43**(1): 2-6.
Ready, A. E. and G. Morgan (1984). "The physiological response of siberian husky dogs to exercise: effect of interval training." Can Vet J **25**(2): 86-91.
Reynolds, A. J., L. Fuhrer, et al. (1994). "Lipid Metabolite responses to Diet and Training in Sled dogs." J Nutr **124**: 2754-2759.
Rhee, S. G., H. Z. Chae, et al. (2005). "Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free Radical Biology and Medicine **38**(12): 1543-1552.
Ristow, M. and S. Schmeisser (2011). "Extending life span by increasing oxidative stress." Free Radical Biology and Medicine **51**(2): 327-36.
Rodriguez, M. C., J. Rosenfeld, et al. (2003). "Plasma malondialdehyde increases transiently after ischemic forearm exercise." Med Sci Sports Exerc **35**(11): 1859-65.
Rose, R. J. and M. S. Bloomberg (1989). "Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on haematology, serum biochemistry and muscle metabolites." Res Vet Sci **47**(2): 212-218.
Rovira, S., A. Munoz, et al. (2007). "Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions." Vet Clin Pathol **36**(1): 30-5.
Rozenberg, O. and M. Aviram (2006). "S-Glutathionylation regulates HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity." Biochemical and Biophysical Research Communications **351**(2): 492-498.
Ruckebusch, Y., L. P. Phaneuf, et al. (1991). Body Temperature Regulation. Physiology of Small and Large Animals. D. Inc. Philadelphia**:** 399-406.
Sachdev, S. and K. J. A. Davies (2008). "Production, detection, and adaptative responses to free radicals in exercise." Free Radical Biology and Medicine **44**: 215-223.
Sacheck, J. M. and J. B. Blumberg (2001). "Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercice." Nutrition **17**(10): 809-814.
Schmidt-Nielsen, K., W. L. Bretz, et al. (1970). "Panting in Dogs: Unidirectional Air Flow over Evaporative Surfaces." Science **169**(3950): 1102-1104.
Seifi-Skishahr, F., M. Siahkohian, et al. (2008). "Influence of aerobic exercise at high and moderate intensities on lipid peroxidation in untrained men." J Sports Med Phys Fitness **48**(4): 515-21.
Selye, H. (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agents." Nature **138**: 32.
Selye, H. and C. Fortier (1949). "Adaptive reactions to stress." Proc A Research Nerv & Ment Dis **29**: 3.
Shing, C. M., J. M. Peake, et al. (2007). "The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress." Appl Physiol Nutr Metab **32**(4): 677-85.
Simon-Schnass, I. and H. Pabst (1988). "Influence of vitamin E on physical performance." Int J Vitam Nutr Res **58**(1): 49-54.
Snow, D. H., R. Billeter, et al. (1982). "No classical type IIB fibres in dog skeletal muscle." Histochemistry **75**(1): 53-65.
Snow, D. H. and P. S. Guy (1980). "Muscle fibre Composition of a number of limb Muscles on different types of Horses." Res Vet Sci **28**: 137-144.
Steiss, J. E. and J. C. Wright (2008). "Respiratory alkalosis and primary hypocapnia in Labrador Retrievers participating in field trials in high-ambient-temperature conditions." Am J Vet Res **69**(10): 1262-67.
Stickland, M. K., A. T. Lovering, et al. (2007). "Exercise-induced arteriovenous intrapulmonary shunting in dogs." Am J Respir Crit Care Med **176**(3): 300-5.
Sun, A. Y., A. Simonyi, et al. (2002). "The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols." Free Radical Biology and Medicine **32**(4): 314-318.
Tessier, F. and P. Marconnet (1995). "Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice." Science & Sports **10**: 1-13.

Thiébault, J. J., S. Motta, et al. (2010, 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."

Tissier, M. (2011). Contribution à l'étude du stress oxydant d'effort chez le chien de cross canin. Marcy l'Etoile, ENVL. **Doctorat Vétérinaire**.

Toll, P. W., R. L. Pieschl, et al. (1992). The effect of dietary fat and carbohydrate on sprint performance in racing greyhound dogs. 8th International Racing Greyhound Symposium, Gainesville, Florida., North American Veterinary Conference.

Tomas, M., R. Elosua, et al. (2002). "Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase1 activity." J Lipid Res **43**(5): 713-20.

Toniolo, L., L. Maccatrozzo, et al. (2007). "Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1915-26.

Tsakiris, S., G. A. Karikas, et al. (2009). "Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals." Eur J Clin Nutr **63**(2): 215-21.

Tsuda, K., A. Yoshikawa, et al. (2003). "Effects of mild aerobic physical exercise on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(5-6): 382-6.

Urso, M. L. and P. M. Clarkson (2003). "Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation." Toxicology **189**: 41-54.

Valgimigli, L., G. F. Pedulli, et al. (2001). "Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique." Free Radical Biology and Medicine **31**(6): 708-716.

Walters, J. M., T. B. Hackett, et al. (2010). "Polyunsaturated Fatty Acid dietary supplementation induces lipid peroxidation in normal dogs." Vet Med Int: 1-4.

Watt, T., T. T. Romet, et al. (1974). "Letter: Vitamin E and oxygen consumption." Lancet **2**: 354-355.

West, J. B., O. Mathieu-Costello, et al. (1993). "Stress failure of pulmonary capillaries in racehorses with exercise-induced pulmonary hemorrhage." J Appl Physiol **75**(3): 1097-1109.

Willard, M. D. and H. Tvedten (2004). Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 4th edition.

Wolter, R. (1987). "La Nutrition de l'Animal de Sport." Science & Sports **2**: 63-93.

Wyse, C., A. Cathcart, et al. (2005). "Effect of maximal dynamic exercise on exhaled ethane and carbon monoxide levels in human, equine, and canine athletes." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **141**(2): 239-46.

Youngman, L. D. (1993). "Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared: effects on DNA damage, carcinogenesis, and oxidative damage." Mutation Research/DNAging **295**(4-6): 165-179.

ANNEXES

Annexe I. Feuille de renseignements remplies par le musher concernant les chiens, leur alimentation et leur entrainement.

Coordonnées du Musher

Nom……
Adresse……
……
……

Téléphone……
Mail……

Informations sur les chiens

Nom	Race	Age	Sexe	Traitement en cours/ Affections antérieures

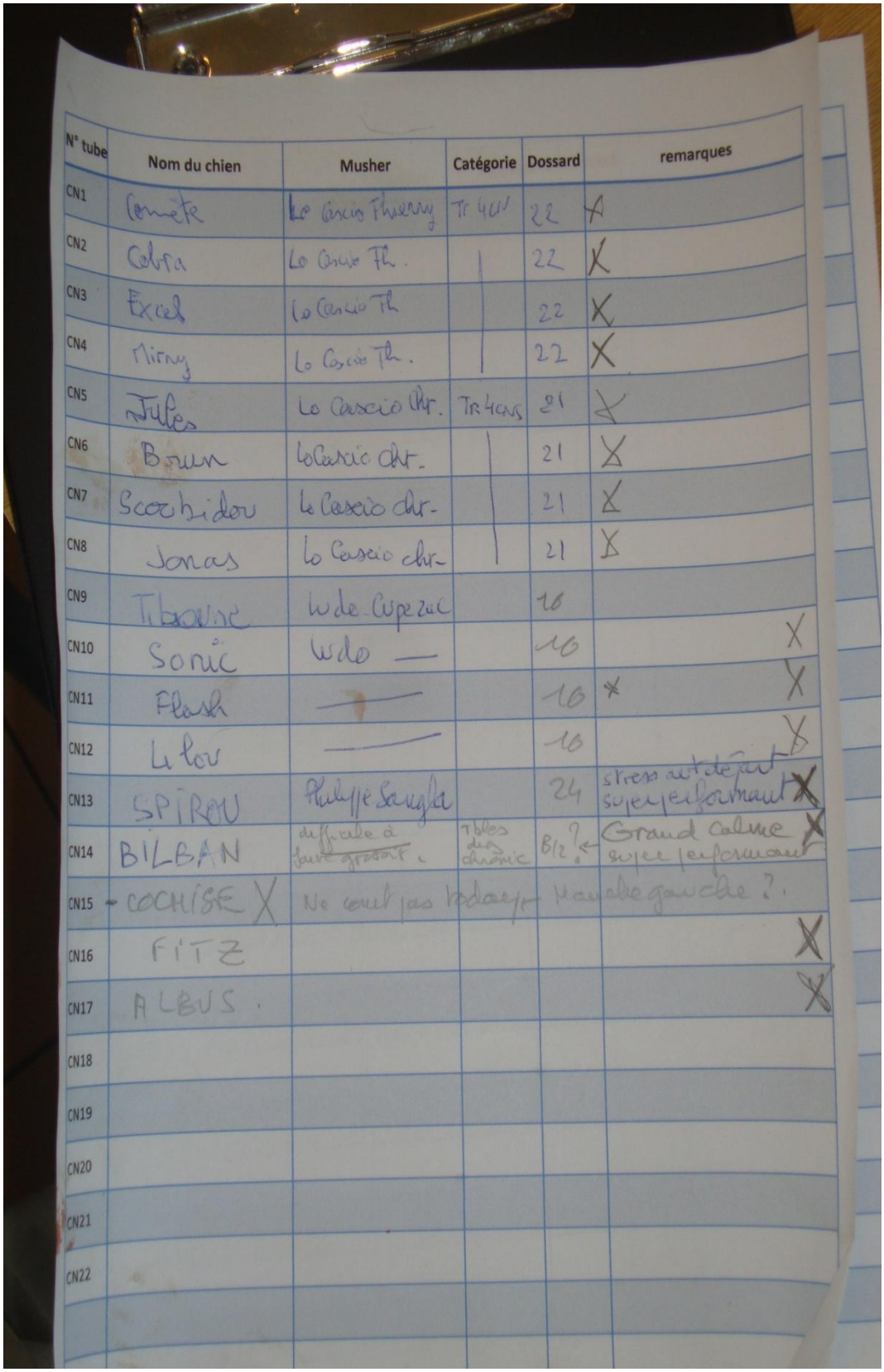
Alimentation

Type d'aliment
……
……
……
Quantité et fréquence de repas ……
……
……
……
……
"Snacks"……
……
Supplémentation (antioxydants et autres)……
……
……
……

Entrainement

……
……
……

Annexe II. Feuille de correspondance entre le numéro du tube et le nom du chien



N° tube	Nom du chien	Musher	Catégorie	Dossard	remarques
CN1	Comète	Le Cascio Thierry	Tr 4ans	22	X
CN2	Cobra	Le Cascio Th.		22	X
CN3	Excel	Le Cascio Th		22	X
CN4	Mirny	Le Cascio Th.		22	X
CN5	Jules	Le Cascio Chr.	Tr 4ans	21	X
CN6	Brun	Le Cascio chr.		21	X
CN7	Scouhidou	Le Cascio chr.		21	X
CN8	Jonas	Le Cascio chr.		21	X
CN9	Tibouse	Wde Cupzac		10	
CN10	Sonic	Wdo —		10	X
CN11	Flash	—		10	X
CN12	Lilou	—		10	X
CN13	SPIROU	Philippe Sangla		24	stress au départ super performant X
CN14	BILBAN	difficile à faire grossir.	Tables du chenil	B/2 ?	Grand calme super performant X
CN15	COCHISE X	Ne veut pas bodaser		Mauvais gauche ?	
CN16	FITZ				X
CN17	ALBUS				X
CN18					
CN19					
CN20					
CN21					
CN22					

Annexe III. Tableau de Spearman

La table fournit les valeurs critiques au-delà desquelles les coefficients de corrélation de Spearman obtenus sont significatifs. Pour des échantillons de taille n, on prendra n comme degrés de liberté.

n	p = 0.05	p = 0.01	n	p = 0.05	p = 0.01
5	1.000		31	.356	.459
6	.886	1.000	32	.350	.452
7	.786	.929	33	.345	.446
8	.738	.881	34	.340	.439
9	.700	.833	35	.335	.433
10	.648	.794	36	.330	.427
11	.618	.755	37	.325	.421
12	.587	.727	38	.321	.415
13	.560	.703	39	.317	.410
14	.538	.675	40	.313	.405
15	.521	.654	41	.309	.400
16	.503	.635	42	.305	.395
17	.485	.615	43	.301	.391
18	.472	.600	44	.298	.386
19	.460	.584	45	.294	.382
20	.447	.570	46	.291	.378
21	.435	.556	47	.288	.374
22	.425	.544	48	.285	.370
23	.415	.532	49	.282	.366
24	.406	.521	50	.279	.363
25	.398	.511	60	.255	.331
26	.390	.501	70	.235	.307
27	.382	.491	80	.220	.287
28	.375	.483	90	.207	.271
29	.368	.475	100	.197	.257
30	.362	.467			

LENZI FREDERIC

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU STRESS OXYDANT CELLULAIRE CHEZ LE CHIEN DE TRAINEAU EN COURSE DE SPRINT.

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon*, le 15 décembre 2011*

RESUME :

Le stress oxydant cellulaire se caractérise par la production excessive d'espèces oxydantes dérivées de l'oxygène, dont certaines sont très réactives. La difficulté de son étude réside dans la courte durée de vie des espèces en jeu et dans le fait qu'elles peuvent tout autant assurer des rôles physiologiques au sein de la cellule que se révéler nocives par oxydation des différents composants cellulaires.
Les circonstances d'apparition sont variées : état physiologique, effort, inflammation, hypoxie, etc. Le chien de sport qu'est le chien de traineau est également soumis à un stress oxydant. Le chien de traineau présente en outre diverses particularités physiologiques qui l'y prédisposent : VO_2 max élevée, alimentation hyperlipidique et hyperprotéique, métabolisme musculaire essentiellement oxydatif, travail en altitude, hyperthermie d'effort.
De nombreux travaux indiquent que les chiens réalisant des courses longue distance sont soumis à un stress oxydant significatif. L'absence de publications relatives aux chiens de traineau de sprint nous a conduit à réaliser une étude expérimentale de quelques marqueurs indirects du stress oxydant au cours d'une telle course. Celle-ci nous a permis de confirmer l'intérêt et la pertinence des marqueurs utilisés (PON, fluidité membranaire par RPE) et de mettre en évidence les conséquences de la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène par les chiens suite à l'effort, mais aussi l'adaptation des globules rouges de ces chiens entraînés à la présence des espèces réactives, et l'absence de dommages musculaires majeurs.
Les enjeux futurs consistent à étudier l'évolution de ces marqueurs au cours d'une saison d'entrainement et l'impact d'une complémentation antioxydante pendant cette période ainsi qu'au moment des épreuves.

MOTS CLES :

- Chiens de traîneau
- Stress oxydatif
- Paraoxonases
- Effort physique
- Résonance paramagnétique électronique
- Propanedial

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Claude GHARIB

1er Assesseur : Monsieur le Professeur Jean-Jacques THIEBAULT
2ème Assesseur : Monsieur le Professeur Jean-Pierre GENEVOIS

DATE DE SOUTENANCE : jeudi 15 décembre 2011

ADRESSE DE L'AUTEUR : 3, rue Louis Rouffe
13014 Marseille