

**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2020 - Thèse n° 038

***ETUDE DU STRESS OXYDATIF CHEZ LE CHIEN DE  
TRAINEAU : UTILISATION DU PORPHYRA UMBILICALIS***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 8 Octobre 2020  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*PEYTOUREAU Fanny*



VetAgro Sup





**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2020 - Thèse n° 038

***ETUDE DU STRESS OXYDATIF CHEZ LE CHIEN DE  
TRAINEAU : UTILISATION DU PORPHYRA UMBILICALIS***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)  
et soutenue publiquement le 8 Octobre 2020  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*PEYTOUREAU Fanny*



VetAgro Sup





## Listes des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (01/09/2019)

ABIT BOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEGROS	Vincent	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGENTET	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



# Remerciements

***A Monsieur le Professeur François MION***

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse  
Qu'il reçoive ici l'expression de nos hommages très respectueux

***A Monsieur le Docteur Jean-Jacques THIEBAULT***

De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
Pour avoir accepté de m'accompagner dans ce travail,  
Pour son aide et ses conseils apportés pour sa réalisation,  
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect

***A Monsieur le Docteur Sébastien LEFEBVRE***

De VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon  
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de prendre part à notre jury de thèse,  
Pour son aide et son implication dans ce travail,  
Mes sincères remerciements









# Table des matières

Liste des annexes.....	15
Liste des figures.....	17
Liste des tableaux.....	19
Liste des abréviations.....	21
Introduction.....	23
Première partie : .....	25
Étude bibliographique.....	25
I. Présentation d'un sport extrême : les courses de chiens de traîneau.....	27
A. Les différentes disciplines sur neige : Sprint, moyennes distances, longues distances et ski-joëring.....	27
B. Les différentes catégories de chiens .....	29
C. Particularités de la course de La Grande Odysée Savoie Mont Blanc .....	31
1. Types d'épreuves.....	31
2. Conditions climatiques et topographiques liées à la course de montagne .....	32
3. Les races de chiens présentes .....	34
D. Physiologie de l'effort chez le chien de traîneau .....	35
1. Définition d'un « effort physique » .....	35
2. Efforts musculaires chez le chien de traîneau.....	36
i. Les différents types de fibres musculaires et leurs rôles .....	36
ii. Les différentes voies métaboliques en fonction de la durée et de l'intensité de l'effort fourni.....	37
iii. Adaptation des systèmes cardio-vasculaire et respiratoire .....	40
a. Facteurs influençant les performances sportives .....	40
b. La VO <sub>2</sub> max des chiens de traîneaux.....	41
3. Besoins énergétiques du chien de traîneau .....	41
E. Principales affections des chiens de traîneau .....	42
1. Les affections musculo-squelettiques .....	43
i. Les affections musculaires.....	43
2. Les affections gastro-intestinales.....	45
3. Les autres affections fréquemment rencontrées chez le chien de traîneau .....	46
II. Le stress oxydatif.....	49
A. Notion de stress et définition du stress oxydatif cellulaire.....	49

B.	Origine du stress oxydatif.....	50
1.	Structure et propriétés de la molécule d'oxygène O <sub>2</sub> .....	50
2.	Formation d'entités réactives de l'oxygène .....	51
i.	Les principales espèces non radicalaires.....	51
a.	L'oxygène singulet <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	51
b.	Le peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
c.	L'acide hypochloreux HOCl.....	53
d.	Le peroxydinitrite NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	54
ii.	Les principales espèces radicalaires .....	54
a.	L'anion superoxyde O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	54
b.	Le radical hydroxyle HO <sup>•</sup> .....	55
c.	L'oxyde nitrique NO <sup>•</sup> .....	56
d.	Les radicaux peroxydes LOO <sup>•</sup> .....	56
iii.	Principales sources exogènes.....	57
a.	L'alimentation.....	57
b.	Les autres sources exogènes .....	58
iv.	Principales sources endogènes .....	60
a.	La chaîne respiratoire mitochondriale .....	60
b.	Les cellules de l'inflammation .....	61
c.	Les NADPH oxydases .....	62
d.	La myéloperoxydase.....	62
e.	Les monoxydes d'azote synthétases (NOS).....	62
f.	Les métaux de transition .....	63
g.	Le peroxydosome et les oxydases des peroxydosomes .....	64
h.	Les cytochromes P450.....	64
i.	Les xanthines oxydoréductase .....	65
3.	Effets bénéfiques des ROS.....	66
i.	Rôles de lutte contre les pathogènes.....	66
ii.	Rôles dans la signalisation cellulaire .....	66
4.	Effets macromoléculaires néfastes des ROS .....	67
i.	Altérations de l'ADN.....	67
ii.	Altérations des lipides .....	68
iii.	Altérations des protéines .....	70
iv.	Altérations de la mitochondrie.....	72
C.	Les systèmes de défense cellulaire contre le stress oxydatif.....	74

1.	Systèmes enzymatiques spécifiques .....	74
i.	La superoxyde dismutase .....	74
ii.	La glutathion peroxydase .....	75
iii.	La catalase .....	76
iv.	Autres enzymes antioxydantes .....	76
2.	Système de défense non spécifique : les agents antioxydants .....	79
i.	Les agents antioxydants exogènes liposolubles .....	79
a.	La vitamine E .....	79
b.	Les caroténoïdes.....	80
c.	L'ubiquinone.....	81
ii.	Les agents antioxydants exogènes hydrosolubles .....	82
a.	La vitamine C .....	82
b.	Les polyphénols .....	82
c.	Les phytates.....	83
iii.	Les oligo-éléments.....	83
iv.	Les agents antioxydants endogènes.....	84
a.	Le système glutathion .....	84
b.	L'acide $\alpha$ -lipoïque .....	85
c.	L'acide urique .....	86
d.	La bilirubine .....	86
d.	La taurine.....	86
e.	Les protéines chaperonnes HSP70 .....	87
f.	Les chélateurs du fer .....	88
3.	Causes de diminution des défenses antioxydantes cellulaires .....	91
4.	Régulation des systèmes anti-oxydant liée à l'exercice .....	92
D.	Conséquences délétères du stress oxydatif induit par l'exercice à l'échelle de l'organisme	93
1.	A courts termes .....	93
i.	Les conséquences du stress oxydatif sur les fibres musculaires .....	93
ii.	Lésions des globules rouges .....	94
iii.	Les diarrhées liées à l'effort .....	95
iv.	Insuffisance rénale .....	97
2.	A longs termes.....	97
i.	Effets cancérogènes .....	97
ii.	Dégénérescence oculaire .....	98
iii.	Dégénérescence du système nerveux central.....	99

E.	Principaux outils de caractérisation du stress oxydatif.....	100
1.	Méthodes directes d'évaluation du stress oxydatif : dosages des ROS et des composés pro-oxydants .....	100
i.	Résonance paramagnétique électronique (RPE).....	100
ii.	La chimioluminescence .....	101
iii.	Dosages des oligo-éléments.....	101
iv.	Dosages des enzymes pro-oxydantes.....	102
2.	Méthodes indirectes d'évaluation du stress oxydatif : dosage des produits de l'oxydation.....	103
i.	Produits d'oxydation des lipides .....	103
a.	Dosage des aldéhydes .....	104
b.	Dosages des diènes conjugués .....	105
c.	Mesure des alcanes expirés .....	106
d.	Dosage des LDL oxydés.....	106
e.	Dosage des F2-isoprostanes .....	107
f.	Mesure de la fluidité membranaire des érythrocytes par RPE .....	107
ii.	Produit de l'oxydation de l'ADN : Dosage du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 8OH-dG	108
iii.	Dosage des produits de l'oxydation des peptides et protéines .....	108
3.	Evaluation du statut antioxydant .....	110
i.	Dosage sanguin et évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes .....	111
ii.	Dosage de quelques antioxydants marqueurs du stress oxydatif.....	111
iii.	Mesure de la capacité antioxydante globale plasmatique.....	114
4.	Corrélation entre les paramètres biochimiques et le stress oxydatif .....	114
F.	Les facteurs prédisposant au stress oxydatif chez les chiens de traîneau .....	119
1.	Augmentation de la consommation d'O <sub>2</sub> .....	119
2.	L'effort intense prolongé.....	119
i.	Les principales voies de production de ROS au cours de l'effort .....	120
ii.	Evolution des capacités antioxydantes au cours de l'effort.....	122
iii.	Le stress oxydatif dépend du type d'effort .....	122
3.	L'altitude.....	123
4.	L'hyperthermie liée à l'effort .....	124
5.	L'alimentation.....	124
6.	Le stress psychologique.....	125
8.	La luminosité .....	126
III.	Antioxydants disponibles pour la prévention du stress oxydatif chez le chien de traîneau	127

A.	Principaux anti-oxydants liposolubles et hydrosolubles apportés par l'alimentation.....	127
1.	La vitamine E .....	127
2.	La vitamine C .....	128
3.	La taurine.....	129
4.	Le sélénium.....	129
5.	L'ubiquinone.....	130
6.	Les caroténoïdes.....	131
7.	Les polyphénols .....	131
B.	Etude des propriétés antioxydantes du <i>Porphyra umbilicalis</i> .....	132
C.	Le glutathion et la N-acétylcystéine .....	133
D.	L'allopurinol.....	133
E.	Un traitement prometteur : les activateurs de Nrf2 .....	134
F.	Importance de l'entraînement .....	135
G.	Habitude à l'altitude .....	136
H.	Limiter le stress physique et psychologique .....	136
	Seconde partie :.....	139
	Etude expérimentale - Utilisation d'un traitement à base de <i>Porphyra umbilicalis</i> chez des chiens de traîneau durant une course de moyenne distance : La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc .....	139
I.	Cadre de la mise en place de l'étude .....	141
A.	Importance du stress oxydatif chez le chien de traîneau à l'effort.....	141
B.	Manque de données concernant les effets anti-oxydants du <i>Porphyra umbilicalis</i> chez le chien .....	141
II.	Présentation du médicament Protéostress® de Wamine .....	141
A.	Composition du Protéostress® .....	141
B.	Résumé des caractéristiques du produit.....	143
1.	Indications recommandées par Wamine® .....	143
2.	Posologie recommandée.....	143
III.	Protocole d'étude du médicament Protéostress® .....	144
A.	Objectif .....	144
B.	Matériels et méthodes .....	144
1.	Sélection des chiens de l'étude et échantillonnage .....	144
2.	Caractéristiques des chiens sélectionnés pour l'étude .....	146
3.	Consentement éclairé .....	146
4.	Protocole d'étude.....	147
i.	Administration per os des gélules de Protéostress et de placebo .....	147

ii.	Réalisation des prises de sang à J1 et J9 de la course .....	147
iii.	Suivi des diarrhées J1 et J9 .....	148
5.	Analyses des échantillons : biochimie et numération formule sanguine.....	149
IV.	Présentation des résultats de l'étude et étude statistique .....	150
A.	Comparaison des CK.....	150
B.	Comparaison des ASAT.....	152
C.	Comparaison des ALAT.....	153
D.	Comparaison des CRP.....	155
E.	Comparaison de l'incidence des diarrhées .....	156
V.	Discussion.....	157
	Conclusion .....	1612
	Bibliographie .....	161
	Annexes .....	175



## Liste des annexes

Annexe 1 : Document de présentation du protocole d'étude et de demande d'accord à destination des mushers (Peytoureau F., 2020).....	175
Annexe 2 : Document de présentation du protocole de prises de sang réalisées le 11 et 19 janvier 2020(Peytoureau F., 2020).....	176



# Liste des figures

Figure 1 : Huskies (1) et Alaskan Huskies (2), lors de l'édition 2019 de la LGO (Peytoureau F., 2019).	29
Figure 2 : Photo d'Eurohounds au départ de Praz de Lys, lors de la deuxième étape de la LGO, le dimanche 13 janvier 2019 (Peytoureau F., 2019) .....	30
Figure 3 : Installation des mushers et de leurs chiens à la base polaire, lors de l'épreuve du Bivouac de la LGO (La Grande Odysée Savoie Mont Blanc 2019) .....	31
Figure 4 : Coût énergétique de la course en fonction de la pente chez l'homme (Praz et al. 2011). ..	33
Figure 5 : Evolution de la pression partielle en oxygène et de la pression barométrique en fonction de l'altitude (INSPQ 2016) .....	33
Figure 6 : Organisation structurale du muscle squelettique (Zink, Van Dyke 2018) .....	36
Figure 7 : Voies métaboliques permettant la synthèse d'ATP lors d'un effort avec (1) la voie anaérobie alactiques, (2) la voie anaérobie lactique et (3) la voie aérobie (Rochcongar, Monod 2009).....	38
Figure 8 : Proportion d'utilisation des différentes voies métaboliques, exprimé en % de la VO <sub>2</sub> max (Zink, Van Dyke 2018).....	39
Figure 9 : Chronologie de la mise en place des voies de production d'énergie chez le chien lors d'un effort (Grandjean et al. 2002) .....	39
Figure 10 : Répartition des macronutriments (en pourcentage de matière sèche) dans une ration idéale en compétition : 22 à 40 % de lipides, 10 à 25 % d'extrait non azoté et 37 à 42 % de protéines (Taleux 2019).....	42
Figure 11 : Photos de pattes de chiens de traîneau présentant une affection podale : une dermatite interdigitée (A) et des crevasses (B) (Sigogneau 2019).....	47
Figure 12 : Structure de Lewis de l'oxygène moléculaire (JUNGLUTH G., 2008) .....	50
Figure 13 : Principales réactions biochimiques à l'origine de la production de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> (Miyamoto et al. 2014).....	52
Figure 14 : Schéma bilan des principales réactions de formation des ROS dans la cellule (Peytoureau F., 2020) .....	57
Figure 15 : Principaux organes touchés par le stress oxydatif suite au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (Saha et al. 2017).....	58
Figure 16 : Génération d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie (Kudryavtseva et al. 2016).....	60
Figure 17 : Mécanismes par lesquels la XO génère des ROS lors de phénomènes d'ischémie-reperfusion (Hellsten 2000) .....	65
Figure 18 : Lésions de l'ADN induites par les ROS et leurs conséquences biologiques (Hartmann 2000) .....	68
Figure 19 : mécanismes de l'oxydation des acides gras et de la propagation de la peroxydation lipidique (Cillard, Cillard 2006) .....	69
Figure 20 : Endoperoxydation de l'acide linoléique et formation d'une molécule de malondialdéhyde (MDA) (Tsikas 2017) .....	70
Figure 21 : Oxydation d'un peptide par un radical hydroxyle à l'origine d'une rupture de la liaison peptidique (Tirosh, Reznick 2000).....	71

Figure 22 : Exemple d'addition de Michael sur un acide aminé : l'histidine (Marnett, Riggins, West 2003).....	71
Figure 23 : Effets des ROS sur les systèmes biologiques : théorie du vieillissement radicalaire (Tirosch, Reznick 2000) .....	73
Figure 24 : Cycles catalytiques (1) et (2) et fonctions du système thioredoxine (Zhang et al. 2017) ...	77
Figure 25 : Principaux mécanismes d'action de la superoxyde dismutase SOD, de la glutathione peroxydase GSH-Px, de la catalase CAT et de la glutathion réductase GR (Nandi et al. 2019).....	78
Figure 26 : exemple de caroténoïde : le $\beta$ -carotène (Decker, Clarkson 2000).....	80
Figure 27 : Activités antioxydantes de la taurine intracellulaire (Seidel, Huebbe, Rimbach 2019) .....	87
Figure 28 : Schématisation du principe d'hormésis dans la longévité endothéliale (Thorin-Trescases et al. 2010) .....	92
Figure 29 : Les antioxydants (vitamine E, N-acétyl-cystéine, glutathion et enzymes antioxydantes) diminuent la fatigue musculaire et augmentent l'endurance.....	94
Figure 30 : Méthode du spin trapping : utilisation d'un nitroène pour piéger un radical R• (Asmus 2000).....	101
Figure 31 : Produits résultant d'une oxydation par les ROS (Zwart et al. 1998) .....	104
Figure 32 : Produits de l'oxydation des protéines quantifiables dans les systèmes biologiques (Peytoureau F., 2020) .....	109
Figure 33 : Impact de l'intensité de l'exercice sur le stress oxydatif (Pingitore et al. 2015).....	123
Figure 34 : Données cumulées de la ration de 2 attelages lors de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc 2019 : Augmentation très importante des quantités d'acides gras polyinsaturés et protéines par rapport à la ration d'un chien de race et de poids équivalents, au repos (Taleux 2019) .....	125
Figure 35 : Modèle du déroulement d'un stress chez le chien (Moberg 2000) .....	137
Figure 36 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des CK en UI/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des CK de chaque groupe (Peytoureau F., 2020).....	151
Figure 37 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des ASAT en U/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des ASAT de chaque groupe (Peytoureau F., 2020).....	152
Figure 38 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des ALAT en UI/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des ALAT de chaque groupe (Peytoureau F., 2020).....	154
Figure 39 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des CRP en mg/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des CRP de chaque groupe (Peytoureau F., 2020).....	155
Figure 40 : Graphique en nuage de points, représentant le nombre de diarrhée(s) par chien des groupes Verrum, Placebo et Protéostress au cours de la LGO, ainsi que les moyennes du nombre de diarrhée par chien de chaque groupe (Peytoureau F., 2020) .....	156

# Liste des tableaux

Tableau I : Présentation des différentes catégories d'épreuves de chiens de traîneau en France en 2020 (Fédération Française des Sports de Traîneau 2019).....	28
Tableau II : Présentation des distances parcourues, du dénivelé et de la conditions climatiques des 11 épreuves de la LGO 2020.....	32
Tableau III : Pourcentage des différentes races de chiens composants les catégories nordiques et non nordiques lors de la LGO 2019 (Taleux 2019) .....	35
<i>Tableau IV : Propriétés des principaux antioxydants dans l'organisme (Peytoureau F., 2020) .....</i>	<i>89</i>
Tableau V : Exemples de molécules et leurs techniques de dosages, permettant d'étudier le stress oxydatif in vivo (Peytoureau F., 2020).....	117
Tableau VI : Composition en acide gras de l'huile de Bourrache obtenu par pression à froid des graines de Borago officinalis (Khattab et al. 2017) .....	142
Tableau VII : Posologies de Protéostress <sup>®</sup> recommandées par le laboratoire Wamine <sup>®</sup> (Wamine 2020).....	143
Tableau VIII : Proportions des 3 groupes de chiens : Verrum, Placebo et négatif, dans les 4 attelages de l'étude (Peytoureau F., 2020) .....	145
Tableau IX : Paramètres biochimiques dosés lors de la LGO 2020 (Peytoureau F., 2020).....	149



# Liste des abréviations

ALAT : Alanine aminotransférase  
Alb : Albumine  
ASAT : Aspartate aminotransférase  
ATP : Adénosine-triphosphate  
CAT : Catalase  
Cl<sup>-</sup> : Chlore  
CK : Créatinine kinase  
CRP : Protéine C Réactive  
Cu : Cuivre  
DTNB : 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)  
Fe : Fer  
GB : Globules blancs  
GC-MS : Gaz Chromatography – Mass Spectrometry  
Glu : Glucose  
GPX : Glutathion Peroxydase  
GSH : Glutathion  
GR : Glutathion Réductase  
Gra : Granulocytes  
GRs : Globules rouges  
Hb : Hémoglobine  
HNE : 4-hydroxy-2-nonenal ou 4-hydroxyalkenal  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HSP : Heat Shock Protein  
Ht : Hématocrite  
K<sup>+</sup> : Potassium  
LD : Longues distances  
LDL : Low density lipoprotein  
LGO : La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc  
Lymph : Lymphocytes  
MD : Moyennes distances  
MDA : Malondialdéhyde  
Mono : Monocytes  
mL : Millilitre  
Mn : Manganèse  
MPO : Myéloperoxydase  
Na<sup>+</sup> : Sodium  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NOS : Nitric Oxide Synthase  
NOX : NADPH Oxydase  
Nrf2 : Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2  
PAL : Phosphatase alcaline  
PCT : Plaquettes  
PNE : Polynucléaires éosinophiles  
PT : Protéines totales  
RNI : Recommended Nutrient Intake  
RPE : Résonance paramagnétique nucléaire  
ROS : Reactive Oxygene Species  
Se : Sélénium  
SFN : Sulforaphane  
SNC : Système nerveux central  
SOD : Superoxyde Dismutase  
SP : Sprint  
TBA : Thiobarbituric Acid  
Trx : Thioredoxine  
TrxR : Thioredoxine Réductase  
VO<sub>2</sub> max : consommation maximale d'oxygène  
XO : Xanthine Oxydase  
Zn : zinc



# Introduction

Le stress oxydatif se définit par un déséquilibre entre la production et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène – qui sont des dérivés de l'oxygène pouvant réagir avec les molécules du vivant – aboutissant à leur accumulation au sein de la cellule. Depuis la découverte du stress oxydatif cellulaire dans les années 50, de multiples études ont permis de mettre en évidence ses caractéristiques, ses composantes, ses facteurs favorisants, et ses nombreuses conséquences physiologiques et pathologiques pour l'organisme.

Il a été découvert que l'activité physique était un des facteurs favorisant l'apparition d'un stress oxydatif, et que cela pouvait avoir des conséquences délétères pour l'organisme. Cette découverte a elle-même suscité un grand intérêt de la part des chercheurs, qui voulaient comprendre quel était le lien entre l'exercice et le stress oxydatif mais également comment il était possible de limiter les conséquences de ce stress oxydatif généré par l'effort.

On parle aujourd'hui fréquemment d'antioxydants en médecine humaine et animale, sans toujours savoir ce que cela signifie. Ce travail va nous permettre d'éclairer la notion de stress oxydatif et d'antioxydant, et nous montrerons par la suite que l'équilibre entre les éléments pro-oxydants et antioxydants dans l'organisme, est un point essentiel pour maintenir l'organisme en bonne santé. Nous verrons en ce sens qu'il est essentiel de veiller à un apport suffisant, mais non excessif, d'antioxydants via l'alimentation notamment.

Dans notre étude nous allons nous intéresser particulièrement aux chiens de traîneau, qui nous le verront, sont des athlètes de haut niveau qui peuvent être soumis eux aussi à un stress oxydatif. De ce fait, de nombreuses recherches ont étudié l'intérêt de suppléments en antioxydants chez le chien de traîneau.

Nous allons inscrire notre étude dans ce cadre de recherche. En effet nous étudierons l'influence d'une supplémentation antioxydante sur le stress oxydatif du chien de traîneau lors de l'édition 2020 de la course Grande Odyssée Savoie Mont Blanc. Cette supplémentation sera un complément alimentaire commercialisé par le laboratoire Wamine (Protéostress<sup>®</sup>). Nous allons plus particulièrement étudier les propriétés antioxydantes d'un des principes actifs du Protéostress<sup>®</sup>, l'algue rouge *Porphyra umbilicalis*, ainsi que son efficacité antioxydante lors de la course.

Pour étudier ces différents points, nous détaillerons tout d'abord dans la partie bibliographique de ce travail les courses de chiens de traîneau, puis nous étudierons les propriétés du stress oxydatif, et enfin nous verrons quels sont les antioxydants disponibles en médecine vétérinaire dans le but de diminuer le stress oxydatif chez les chiens de traîneau. Nous présenterons les résultats de notre étude dans la partie expérimentale de ce travail, et essaierons de répondre à notre problématique.



**Première partie**  
**Étude bibliographique**



## I. Présentation d'un sport extrême : les courses de chiens de traîneau

Si les chiens sont utilisés par l'homme depuis environ 8000 ans pour tirer des traîneaux, ce n'est qu'en 1907 que naît la première course de chiens de traîneau à Nome, en Alaska. Depuis les courses se sont diversifiées, et il est possible de retrouver ainsi aujourd'hui dans différents pays, des courses de longueurs et d'organisations variées (Jaffrezic 2020).

### A. Les différentes disciplines sur neige : Sprint, moyennes distances, longues distances et ski-joëring

Il existe aujourd'hui de nombreuses catégories de courses de chiens de traîneau. Nous retrouvons principalement des courses de très longues distances au Canada et en Alaska, pays berceaux du chien de traîneau.









En France, les épreuves de chiens de traîneau sur neige sont divisées en 3 catégories principales que sont :

- ❖ Les épreuves de sprint – notées SP – avec des distances parcourues allant de 7 à 25 km,
- ❖ Les épreuves de moyennes distances – notées MD – avec des distances parcourues entre 20 à 60 km
- ❖ Les épreuves de longues distances – notées LD – lors desquelles chaque étape doit faire au minimum 50 km.

Pour chaque catégorie, il est possible de choisir le nombre de chiens qui composent l'attelage, comme illustré dans le Tableau I présentant les catégories officielles des compétitions de chiens de traîneau en France (Fédération Française des Sports de Traîneau 2019).

Les disciplines sur neiges comprennent également le ski-joëring, qui est une discipline lors de laquelle les ski-joëreurs sont tractés à ski par un unique chien. Cette discipline est notamment représentée par une compétition composée de 3 étapes lors de la Grande Odyssée Savoie Mont Blanc.

Tableau I : Présentation des différentes catégories d'épreuves de chiens de traîneau en France en 2020 (Fédération Française des Sports de Traîneau 2019)

Tableau des catégories en fonction des âges sur les courses « on snow » de la FFST					
8 à 9	10 à 11	12 à 13	14 à 16 Juniors	16 ans et plus	
Enfants			Elite		Disciplines
SPupille	SMinime	SCadet (12 à 14 ans)	SMJ (15 - 20 ans) SWJ (15 - 20 ans)	SM1 SW1 S1NB S1NB2	 Ski joering
SP2Pupille			SP2J	SP2 SP2NB SP2NB2	 Traîneau 2 chiens sprint
	SMinime 2 ou 3 chiens	SPCadet 2, 3 ou 4 chiens	SP4J	SP4 SP4NB SP4NB2	 Traîneau 4 chiens sprint
				SP6 SP6NB SP6NB2 SP8 SP8NB SP8NB2 SPU SPUNB SPUNB2	 Traîneau 6, 8 et 12 chiens sprint
				MD6 MD6NB MD6NB2 MD12 (+ 18 ans) MD12NB (+ 18 ans) MD12NB2 (+ 18 ans)	 Traîneau moyenne distance 6 ou 12 chiens
				LD8 (+ 18 ans) LD8NB (+ 18 ans) LD8NB2 (+ 18 ans) LDU (+ 18 ans) LDUNB (+ 18 ans) LDUNB2 (+ 18 ans)	 Traîneau longue distance 8 ou 12 chiens
				SPBinôme	 Traîneau avec deux Musers

Alors que les très longues distances se courant en Alaska, telles que la Yukon Quest ou l'Iditarod, prévoient une course en quasi-totale autonomie pour les mushers, qui doivent transporter leur tente et leurs vivres par exemple, ce n'est pas le cas des courses françaises qui prévoient, pour la majorité des compétitions (Peyronnet 2017), des étapes chaque jour avec des nuits hors de la course, à la fois pour les mushers et les chiens. Cela permet notamment d'alléger les traîneaux, et de se reposer au mieux pour l'épreuve du jour suivant. Il est tout de même possible de retrouver lors des compétitions françaises des épreuves appelées épreuves de bivouac, que nous détaillerons dans la partie concernant les particularités de la course Grande Odyssée Savoie Mont Blanc.

## B. Les différentes catégories de chiens

Si nous remontons aux origines du sport de chiens traîneau, les chiens étaient sélectionnés pour leur robustesse et leur grande taille. Au fil des années, la recherche de performances sportives, et la diversification des compétitions ont fait apparaître de nouvelles races de chiens de traîneau de plus en plus endurantes et rapides (Yukon Quest Website 2013).

Aujourd'hui il est possible de séparer les races de chiens de traîneau en 2 groupes : les races nordiques et les autres races, fréquemment croisées avec des races de chiens de chasse.

Les races nordiques sont les races historiques du chien de traîneau. On retrouve parmi elles le Husky Sibérien, le Malamute d'Alaska, le Groenlandais et le Samoyède. Une race nordique particulièrement présente aujourd'hui, puisqu'elle représente 90% des chiens de traîneau dans le monde, est l'Alaskan Husky (La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc 2019). Cette race n'est pas reconnue officiellement, car elle est en constante évolution, et est issue de croisement entre le Husky et diverses autres races. La morphologie et la phanéroptique des Alaskan Huskies sont très variables d'un individu à l'autre, et peuvent, chez certains individus, se rapprocher du Husky, ou au contraire, chez d'autres, du chien de chasse. Elle est le résultat d'une sélection génétique réalisée depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle afin d'obtenir des chiens rapides, résistants, endurants, avec une très bonne aptitude à écouter leur musher et à travailler en groupe. Une autre des caractéristiques pour laquelle la race a été sélectionnée, et qui est sûrement la plus importante de toute, et l'envie de tirer et de courir, et ce même sur de longues distances, c'est ce qu'on appelle le « will to go ». Ces chiens athlétiques sont plus petits que leurs prédécesseurs nordiques, puisqu'ils pèsent en moyenne entre 20 et 25 kg, comme illustré sur la Figure 1 (Yukon Quest Website 2013).



Figure 1 : Huskies (1) et Alaskan Huskies (2), lors de l'édition 2019 de la LGO (Peytoureau F., 2019)

Lors des courses de sprint et de moyenne distance, il est également de plus en plus fréquent de voir des attelages composés de chiens à poils ras, croisés avec des races de chiens de chasse telle que le Pointer.

On retrouve aujourd'hui principalement un type de chien appelée Eurohound (Figure 2), issue d'un croisement entre l'Alaskan Husky et certaines races de chiens de chasse telles que le Pointer, le Braque Allemand et le Setter Anglais par exemple. Un autre type de chien fréquemment rencontré est le Greyster, issu d'un croisement entre un Greyhound et un Braque Allemand.

Ces croisements, non reconnus officiellement comme étant des races, ont été sélectionnés principalement pour leur rapidité. Les chiens qui en sont issus sont donc très performants pour les courses de sprint et de moyenne distance. En revanche, du fait de leurs poils ras notamment, les Eurohounds et les Greysters sont moins adaptés que les races nordiques aux courses de longues distances et aux nuits en bivouac (La Grande Odysée Savoie Mont Blanc 2019).



*Figure 2 : Photo d'Eurohounds au départ de Praz de Lys, lors de la deuxième étape de la LGO, le dimanche 13 janvier 2019 (Peytoureau F., 2019)*

Dans la partie suivante, nous détaillerons les spécificités de la course de la Grande Odysée Savoie Mont Blanc, lors de laquelle nous avons eu la chance de travailler pour réaliser ce travail.



## C. Particularités de la course de La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc

La course de chiens de traîneau de La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc – abrégée LGO – est née en 2005 de l'idée de créer une course à travers les massifs des Alpes.

Cette course de 12 jours, composée de 11 étapes, est notamment singulière du fait de son dénivelé cumulé de plus de 10 000 mètres, et de l'altitude de ses étapes, qui oscille entre 1000 et 2000 mètres (La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc 2020).

### 1. Types d'épreuves

Les épreuves de la LGO ont évolué au cours des années, puisque jusqu'en 2017 elle était une course de longues distances avec des épreuves oscillant entre 60 et 80 kilomètres.

Depuis l'édition de la LGO 2020, les épreuves sont devenues uniquement des étapes de moyenne distance, de 32 km en moyenne, en réponse à la diminution de la quantité de neige dans les massifs alpins, et à la demande croissante de courses de moyenne distance de la part des mushers.

Une épreuve de bivouac est également présente au cours de la LGO. Cette épreuve dure 2 jours, et est entrecoupée par un campement de nuit à la Base Polaire du domaine skiable de Val Cenis, lors duquel les mushers doivent installer le couchage de leurs chiens, en paille le plus souvent, et dormir sous une tente (Figure 3).



Figure 3 : Installation des mushers et de leurs chiens à la base polaire, lors de l'épreuve du Bivouac de la LGO (La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc 2019)

En 2020, la moyenne des distances des différentes étapes était de 32 km par jour, avec un dénivelé positif cumulé de 11 410 mètres.

## 2. Conditions climatiques et topographiques liées à la course de montagne

La course en montagne impose des conditions climatiques parfois difficiles, puisque les mushers et leurs chiens doivent faire face au froid parfois extrême et aux tempêtes de neige ou de pluie, comme indiqué dans le Tableau II ci-dessous, qui indique les conditions météorologiques, les distances parcourues et les dénivelés positif et négatif lors des différentes épreuves de la LGO 2020.

Tableau II : Présentation des distances parcourues, du dénivelé et de la conditions climatiques des 11 épreuves de la LGO 2020

n°	Etapes	Longueur	Dénivelé positif	Dénivelé négatif	Conditions météorologiques
1	Montagnes du Giffre - Grand Massif	31 km	1410 m	900 m	Soleil T <sub>moy</sub> = 3,2°C T <sub>max</sub> = 5,2°C T <sub>min</sub> = 1,2°C
2	Praz de Lys Sommand	39 km	1100 m	1100 m	Soleil T <sub>moy</sub> = 3,8°C T <sub>max</sub> = 6,6°C T <sub>min</sub> = 0,9°C
3	Les Gets	31 km	1470 m	1470 m	Soleil T <sub>moy</sub> = 3°C T <sub>max</sub> = 4,8°C T <sub>min</sub> = 1,3°C
4	Megève	15 km	380 m	380 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-0,5°C T <sub>max</sub> =4,5°C T <sub>min</sub> = -5,5°C
5	Pralognan-la-Vanoise	35 km	1400 m	1400 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-2,5°C T <sub>max</sub> =1,5°C T <sub>min</sub> = -6,5°C
6	Valmorel	25 km	1320 m	1390 m	Neige T <sub>moy</sub> =-5,4°C T <sub>max</sub> =-0,5°C T <sub>min</sub> = -10,2°C
7	Peisey-Vallandry	31 km	640 m	640 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-11°C T <sub>max</sub> =-8,1°C T <sub>min</sub> = -13,7°C
8	Bessans - Bonneval-sur-Arc	44 km	630 m	570 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-9,2°C T <sub>max</sub> =-8,4°C T <sub>min</sub> = -9,9°C
9	Aussois	27 km	1040 m	1040 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-5,1°C T <sub>max</sub> =-0,9°C T <sub>min</sub> = -9,2°C
10A	Val Cenis - Base Polaire	37 km	1400 m	710 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-1,5°C T <sub>max</sub> =1,7°C T <sub>min</sub> = -4,8°C
10B	Lac du Mont-Cenis - Val Cenis	36 km	620 m	620 m	Soleil T <sub>moy</sub> =-0,7°C T <sub>max</sub> =2,1°C T <sub>min</sub> = -3,4°C
<b>Moyenne</b>		32 km	1037 m	929 m	
<b>Total</b>		351 km	11410 m	10220 m	

Les tempêtes de neige peuvent rendre la course difficile du fait d'une visibilité moindre, mais également du fait du dépôt d'une couche de neige poudreuse sur le trajet damé, qui rend la progression plus ardue.

La topographie de la course, avec un dénivelé cumulé positif de plus de 10 000 mètres, est également très éprouvante pour les chiens et les mushers. Ces derniers sont souvent amenés à descendre du traîneau pour aider leurs chiens à le tirer. Cela est coûteux en énergie, puisqu'il a été montré chez l'homme que le dénivelé positif, ainsi que les fortes pentes de degré supérieur à 30%, étaient à l'origine d'une perte d'énergie accrue (Figure 4) (Praz et al. 2011).

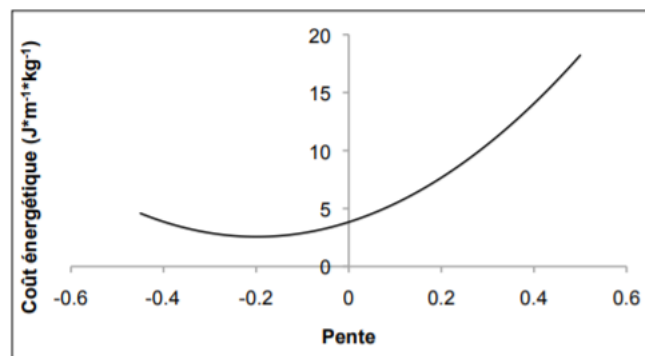


Figure 4 : Coût énergétique de la course en fonction de la pente chez l'homme (Praz et al. 2011).

Enfin, la diminution de la pression partielle en oxygène de l'air avec l'altitude, comme figuré sur la Figure 5, est synonyme de diminution de la quantité d'oxygène par volume d'air inspiré.

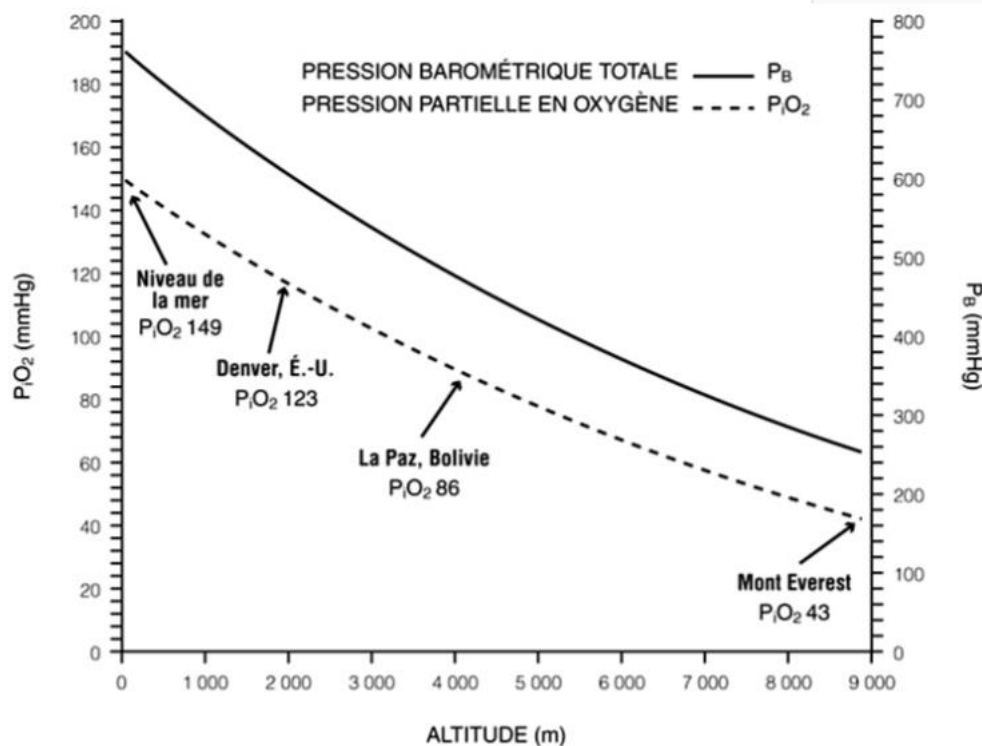


Figure 5 : Evolution de la pression partielle en oxygène et de la pression barométrique en fonction de l'altitude (INSPQ 2016)

En effet, la pression partielle en oxygène est de 149 mmHg au niveau de la mer, et de 123mmHg à 2000 mètres d'altitude. Une étude menée chez des cyclistes étant amenés à 2340 mètres d'altitude, a montré que le premier jour en altitude s'accompagnait d'une baisse significative de 25,8% des performances d'endurance, par rapport au même exercice réalisé au niveau de la mer. Il a été montré que les performances sportives étaient identiques à celles réalisées au niveau de la mer, après de 2 semaines. Deux semaines semblent donc être la durée d'acclimatation à l'altitude minimale permettant de retrouver les performances sportives réalisées au niveau de la mer (Schuler et al. 2007)

Il existe donc un phénomène d'acclimatation qui repose sur des adaptations centrales, avec la production accrue de globules rouges par exemple, et périphériques, comme l'augmentation de la vascularisation des muscles, qui permettent d'optimiser la distribution et l'utilisation de l'oxygène dans l'organisme (Levine, Stray-Gundersen 1997).

Il est probable que l'organisme des chiens de traîneau s'adapte de façon similaire à celui de l'homme à l'altitude, et il serait en ce sens intéressant que les chiens participant à la LGO aient une période d'acclimatation avant de commencer la course. Ce qui n'est pas toujours le cas puisque de nombreux traîneaux provenant d'altitude en dessous de 500 mètres, arrivent le premier jour de la LGO. Les chiens composant ces traîneaux voient donc très probablement leurs capacités de course diminuer du fait de l'altitude.

### *3. Les races de chiens présentes*

Une étude des races présentes lors de la LGO 2019 a permis de montrer la diversité des races présentes lors d'une telle course de moyenne distance.

Dans la catégorie nordique, étaient présents une majorité de Huskies, mais également des Groenlandais et des Malamutes d'Alaska et des Samoyèdes.

Hors catégorie nordique, la majorité des chiens sont des Eurohounds et des Alaskan huskies (Taleux 2019). Le Tableau III ci-dessous représente la proportion des chiens dans chaque catégorie, lors de la LGO 2019 :

Tableau III : Pourcentage des différentes races de chiens composants les catégories nordiques et non nordiques lors de la LGO 2019 (Taleux 2019)

Type de race	Race	Pourcentage des différentes races de chiens
<b>Nordiques</b>		<b>45 %</b>
	Husky de Sibérie	71%
	Malamute d'Alaska	8%
	Samoyède	1%
	Groenlandais	14%
	Croisé nordique	6%
<b>Course / chasse</b>		<b>50 %</b>
	Eurohound	41%
	Alaskan husky	43%
	Greyster	8%
	Braques et pointers	8%
<b>Autres</b>		<b>5%</b>
	Bergers	56%
	Autres races	44%

Les traîneaux les plus rapides sont ceux de la deuxième catégorie. En effet Le vainqueur de la LGO 2020, Rémi Coste a couru la totalité de la course à 20,15 km/h de moyenne avec un traîneau composé de chiens de race Eurohound, tandis que le vainqueur du trophée nordique, Jean Combazard, a couru le même parcours à 15 km/h avec des chiens de race Husky de Sibérie.

#### D. Physiologie de l'effort chez le chien de traîneau

Nous avons vu que les chiens de traîneau étaient de véritables athlètes, capables de réaliser des efforts de très haute intensité et de longue durée. Nous étudierons dans la partie suivante, en quoi l'organisme des chiens de traîneau est adapté pour fournir cet effort, notamment des points de vue mécanique et énergétique.

##### 1. Définition d'un « effort physique »

L'effort physique peut être défini comme un travail musculaire – c'est-à-dire la contraction d'un ou plusieurs groupes musculaires – coûteux en énergie métabolique, et pouvant être à l'origine d'une fatigue physiologique (Coquart 2016).

L'effort peut être maximal ou sous-maximal (Fulco, Rock, Cymerman 1998) :

- ❖ L'effort maximal est défini par une atteinte de la  $VO_2$  max - qui est la capacité maximale du système cardio-respiratoire à délivrer des molécules d'oxygènes aux muscles ainsi que la capacité des muscles à utiliser cet oxygène,

- ❖ L'effort sous-maximal est un effort au cours duquel la  $VO_2$  max n'est pas atteinte,

La partie suivante va nous permettre d'étudier plus précisément le fonctionnement mécanique et métabolique des muscles lors de l'effort, qu'il soit maximal ou sous-maximal.

## 2. Efforts musculaires chez le chien de traîneau

L'effort du chien de traîneau est un effort de course et de traction, qui nécessite la contraction de multiples groupes musculaires.

C'est pour approfondir l'étude de la physiologie de l'effort musculaire chez le chien de traîneau, que nous examinerons dans le paragraphe suivant les différents types de fibres musculaires mises en jeu dans l'effort musculaire du chien de traîneau, ainsi que les différentes voies métaboliques permettant de fournir l'énergie nécessaire à cet effort.

### i. Les différents types de fibres musculaires et leurs rôles

Les muscles squelettiques représentent l'organe le plus volumineux de l'organisme. Ils sont entourés par des fascia, et sont composés de plusieurs faisceaux, eux même composés de nombreuses fibres musculaires. Chaque fibre est constituée de plusieurs unités contractiles appelées sarcomères et représentés sur la Figure 6.

Ces sarcomères peuvent se contracter grâce aux interactions entre des molécules d'actines et de myosines, qui permettent une diminution de la taille du sarcomère, et plus généralement un raccourcissement du muscle. Les interactions entre filaments d'actines et de myosines sont permis par un changement de conformation de la myosine lors de l'hydrolyse de l'ATP par une enzyme appelée ATPase.

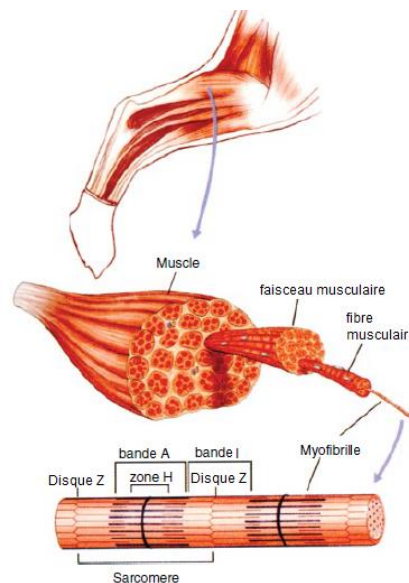


Figure 6 : Organisation structurelle du muscle squelettique (Zink, Van Dyke 2018)

Les muscles sont ensuite classés en différentes catégories en fonction de la proportion et du type de fibres qui les composent :

- ❖ Les muscles dit lents, comme le quadriceps fémoral par exemple, ainsi que de nombreux muscles posturaux, sont des muscles constitués principalement de fibres de type I. Ils sont dits lents car le métabolisme est principalement aérobie, et l'énergie utilisée par les molécules de myosine vient de l'oxydation des acides gras et du cycle de Krebs, qui sont deux voies métaboliques lentes pour la production d'ATP, en comparaison de celle utilisée par les fibres musculaires de type II. Les muscles lents développent une force contractile plus faible et plus lente que les muscles rapides, mais sont en revanche capables de tenir un effort sur une durée plus longue du fait de leur métabolisme aérobie, qui nous le verront, est une voie métabolique qui permet de produire de l'ATP sur le long terme. Ces muscles sont donc résistants à la fatigue et adaptés aux efforts d'endurance.
- ❖ Les muscles dits rapides, comme le muscle gracile par exemple, sont composés majoritairement de fibres de types II. Ils sont capables de se contracter rapidement et puissamment, grâce à l'utilisation de l'ATP issu de la glycolyse, qui est une voie métabolique à l'origine d'une production rapide et anaérobie d'ATP.

Parmi les fibres de types II, il existe différents isoformes qui diffèrent uniquement par la séquence d'acide aminé de leurs ATPases. Dans les muscles des chiens, les fibres IIC sont présentes en grand nombre, et représentent une activité oxydative intermédiaire entre les fibres de type I et les fibres de type IIB.

Plus généralement, les muscles des chiens ont une densité très forte en mitochondrie, ainsi que de hautes capacités oxydatives, ce qui leur confère de bonnes capacités d'endurance (Zink, Van Dyke 2018).

## ii. Les différentes voies métaboliques en fonction de la durée et de l'intensité de l'effort fourni

Nous avons vu que l'énergie utilisée par le muscle était issue de l'hydrolyse de l'ATP. Or les réserves d'ATP musculaires sont épuisées en quelques secondes au début d'un effort. Il faut donc que cet ATP puisse être régénéré rapidement pour conserver l'activité contractile des muscles. Trois voies permettent la production d'énergie utilisables pour la contraction musculaire (Figure 7 et 8) :

La première voie à se mettre en place lors d'un effort est le métabolisme anaérobie alactique représentée par la voie (1) de la Figure 7 et de la Figure 8, qui consiste en l'utilisation du stock d'ATP cellulaire par le muscle, puis en la formation d'ATP à partir de la créatinine phosphate intracellulaire. Lors d'un effort intense, les réserves d'ATP et de créatinine phosphate musculaires peuvent être épuisés en 5 à 7 secondes.



Quelques secondes après le début de l'exercice, la voie anaérobie lactique, représentée par la voie (2) de la Figure 7 et de la Figure 8, prend le relais pour produire de l'ATP. Cette voie repose sur le catabolisme du glucose par glycolyse, lors de laquelle une molécule de glucose permet de produire 2 molécules d'ATP et du pyruvate. Si l'effort est très intense, il est possible que la consommation de glucose soit supérieure à l'apport en oxygène. Dans ce cas le pyruvate est transformé en acide lactique par fermentation. Cette voie n'apparaît pas lors d'exercice de très faible intensité, puisque dans ce cas, le pyruvate produit en plus faible quantité pourra être métabolisé le plus souvent par d'autres groupes musculaires.

Si l'effort se poursuit plus de quelques minutes, la voie aérobie, représentée par la voie (3) de la Figure 7 et de la Figure 8, va également se mettre en place, et permettre au muscle d'accéder à une quantité d'énergie très importante. Cette voie utilise le catabolisme de différents substrats que sont les acides gras, le glucose et les acides aminés. La  $\beta$ -oxydation des acides gras, la glycolyse et l'oxydation des acides aminés fournissent de l'énergie, et produisent des groupements acétyl ensuite dégradés dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs qui permet lui aussi de fournir de l'énergie à la cellule sous forme d'ATP, ainsi que du NADH et l'ubiquinol, nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui produit à son tour de l'ATP. Une molécule de glucose permet ainsi la production de 14 molécules d'ATP par la voie aérobie, dont 2 par glycolyse, une par le cycle de Krebs et 11 par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Cette voie nécessite un apport suffisant en glucides, en acides gras libres à longues chaînes et en acides aminés aux cellules musculaires. Elle peut cependant débuter rapidement lors de l'effort grâce à l'utilisation du glycogène présent dans les cellules et de l'oxygène fixé sur les molécules de myoglobines.

Un des facteurs limitants de la production d'énergie par la voie aérobie est la quantité d'oxygène apportée aux muscles, c'est-à-dire la  $VO_2$  max (Rochcongar, Monod 2009).

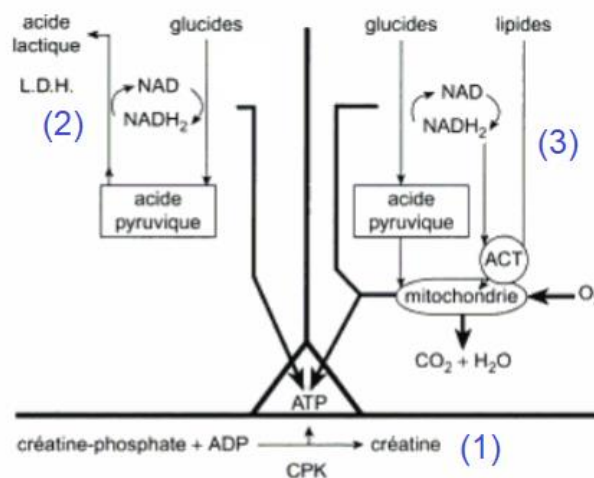


Figure 7 : Voies métaboliques permettant la synthèse d'ATP lors d'un effort avec (1) la voie anaérobie alactique, (2) la voie anaérobie lactique et (3) la voie aérobie (Rochcongar, Monod 2009)



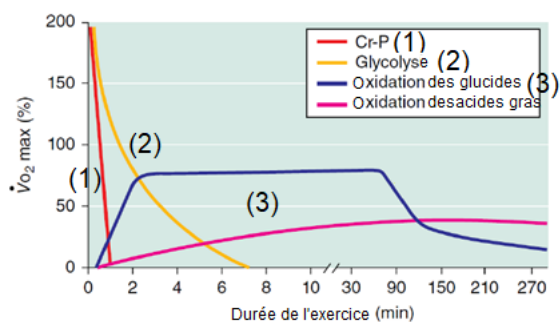
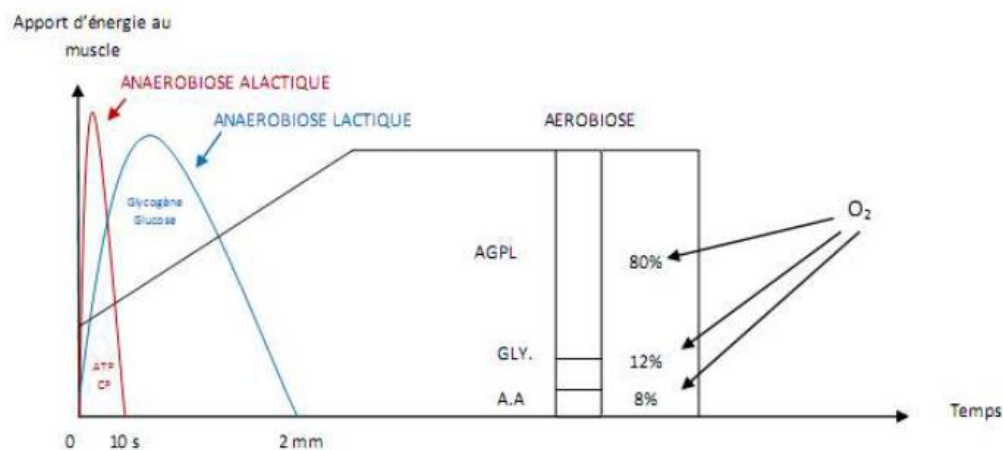


Figure 8 : Proportion d'utilisation des différentes voies métaboliques, exprimé en % de la VO2 max (Zink, Van Dyke 2018)

Chez le chien de traîneau, il a été montré que le substrat principal de la voie aérobie était les acides gras libres à longues chaînes lorsque l'effort dépasse une certaine durée. Nous verrons dans la suite de ce travail que l'importance de la  $\beta$ -oxydation des acides gras a des conséquences sur les besoins nutritionnels du chien de traîneau.

Les proportions de substrats utilisés pour la voie aérobie, ainsi que la chronologie de mise en place des différentes voies de production d'énergie au cours de l'effort chez le chien sont représentées dans le graphique suivant (Figure 9) (Grandjean et al. 2002):



AGPL : acide gras libres plasmatiques  
 Gly : glycogène  
 A.A : acides aminés

Figure 9 : Chronologie de la mise en place des voies de production d'énergie chez le chien lors d'un effort (Grandjean et al. 2002)

Nous avons donc vu que les voies métaboliques n'étaient pas les mêmes en fonction de la durée de l'effort. Cette notion est à nuancer puisque le choix des voies métaboliques dépend aussi de l'intensité de cet effort. En effet il a été montré que des chiens entraînés courant à un rythme modéré, c'est-à-dire pour lequel la  $VO_2$  est inférieure à la  $VO_2$  max, l'apport en oxygène aux muscles est suffisant pour utiliser majoritairement la voie aérobie, avec l'utilisation préférentiel de l'oxydation des acides gras comme source d'énergie. Cet effort est dit sous-maximal.

En revanche lorsque l'effort devient plus intense, avec une atteinte de la  $VO_2$  max, l'énergie provient majoritairement du métabolisme aérobie et anaérobie du glucose. Cet effort est dit supra-maximal.

Lors de courses de moyennes distances, les chiens de traîneau réalisent la majorité du temps un effort sous-maximal, hormis lors de sprint ou de forte augmentation du dénivelé. Cela a pour conséquence que le chien de traîneau parcourant une course de moyenne distance, utilisera préférentiellement la voie aérobie et l'oxydation des acides gras.

Il existe donc 3 voies principales de production d'énergie pour le muscle au cours de l'effort, et nous avons vu que ses voies ne sont pas les mêmes selon la durée et l'intensité de l'exercice.

La partie suivante nous permettra d'étudier quelles sont les adaptations du système cardio-respiratoire qui permettent de fournir l'oxygène nécessaire à l'effort musculaire chez le chien et chez l'Homme.

### iii. Adaptation des systèmes cardio-vasculaire et respiratoire

Il a été montré que l'entraînement permettait d'augmenter les performances sportives, en partie grâce à une adaptation des systèmes cardio-respiratoires qui permettent de fournir des substrats énergétiques et de l'oxygène en quantité adaptée à l'effort musculaire produit (Banse et al. 2007). Cela se traduit notamment par une augmentation de la  $VO_2$  max - que nous avons précédemment défini comme la capacité maximale du système cardio-respiratoire à délivrer des molécules d'oxygènes aux muscles, ainsi que la capacité des muscles à utiliser cet oxygène – mais aussi par une diminution du lactate sanguin.

Cette partie va nous permettre d'étudier quelles sont les adaptations des systèmes cardio-respiratoires des chiens de traîneau permettant une amélioration des performances de courses, ainsi que les modalités de leur mise en place.

#### a. Facteurs influençant les performances sportives

Une étude menée chez 5 chiens de traîneau non entraînés à la course a permis de montrer qu'un entraînement de faible intensité pendant 3 semaines puis de moyenne intensité pendant 4 semaines, permettait d'augmenter la  $VO_2$  max de 10% et de diminuer de 50% le taux de lactate mesuré après 5 minutes d'effort. L'augmentation de la  $VO_2$  max et la diminution du taux de lactates sanguins avec l'entraînement ont également été montrés chez l'homme et chez les chevaux pur-sangs (Banse et al. 2007).

Ces variations sont la conséquence de plusieurs adaptations du système cardio-respiratoire (Coyle et al. 1988) :

- ❖ Augmentation du volume d'air inspiré – id est de la capacité respiratoire – et donc du  $VO_2$ ,
- ❖ Modification du nombre d'enzymes mitochondriales et de la fonction respiratoire des mitochondries, à l'origine d'une augmentation de leur activité dans les cellules musculaires,
- ❖ Augmentation de la densité de capillaire dans les muscles, ce qui permet un apport accru en  $O_2$  aux cellules musculaires, ainsi qu'une élimination sanguine plus rapide des lactates musculaires,

L'effort fourni à l'entraînement permet donc d'augmenter les performances sportives, en induisant des modifications du système cardio-vasculaire. Il a été montré que la  $VO_2$  max, ainsi que le temps nécessaire à l'accumulation des lactates dans le sang, et la densité des capillaires dans les muscles étaient des facteurs déterminant 93% des performances sportives chez des cyclistes entraînés (Coyle et al. 1988).

Une autre adaptation de l'organisme qui revêt une grande importance pour l'augmentation des performances sportives est l'augmentation du taux de fibres de type I par rapport aux fibres de type II dans les muscles avec un entraînement d'endurance. Or nous avons vu que les fibres de types I étaient plus adaptées à un métabolisme aérobie, ce qui permet donc une diminution du taux de lactate produit pendant l'effort (Coyle et al. 1988).

#### b. La $VO_2$ max des chiens de traîneaux

Les chiens de traîneau sont des athlètes exceptionnels du fait notamment de leurs hautes capacités aérobies, avec une  $VO_2$  max pouvant atteindre 198 mL/kg/min, ce qui est très élevé comparativement à d'autres espèces telles que l'homme, pour lequel les athlètes de haut niveau ont une  $VO_2$  max oscillant entre 65 et 85 mL/kg/min, ou encore les chevaux dont la  $VO_2$  max peut atteindre 150 mL/kg/min (Banse et al. 2007).

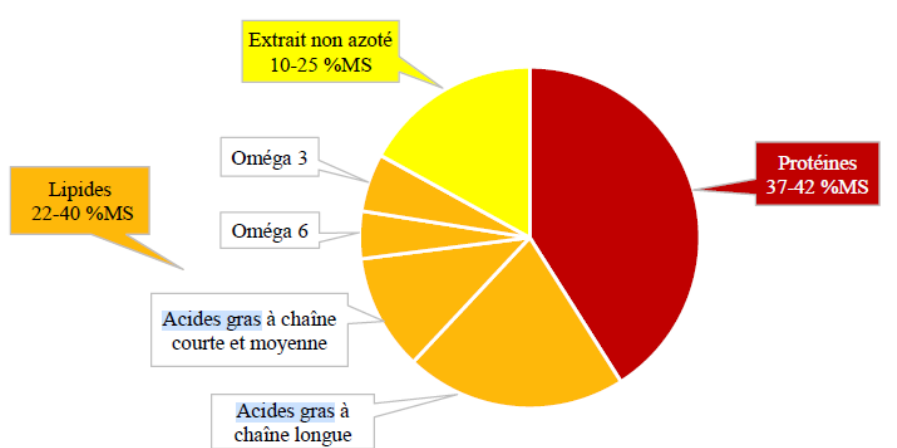
Or nous avons vu que la voie métabolique aérobie était initiée par l'oxydation des lipides, des glucides et des acides aminés. Cela signifie donc que le chien de traîneau doit avoir des apports alimentaires suffisants pour fournir l'énergie nécessaire à la contraction musculaire lors d'une course d'endurance.

### 3. *Besoins énergétiques du chien de traîneau*

Nous avons vu que l'effort de longue durée mettait en jeu la production d'énergie par la voie aérobie dans le muscle, et que cette voie métabolique nécessitait un apport suffisant en acides gras à longues chaînes, en protéines et en glucides. Lors d'une course de longue distance, il a été montré que 80% de l'énergie produite était issue de l'oxydation des acides gras à longues chaînes, 12% du catabolisme du glucose et 8% de l'oxydation des acides aminés (Grandjean et al. 2002).

En outre ces nutriments permettent un renouvellement des tissus, notamment musculaire, pendant et après l'effort.

Il a été montré qu'un équilibre adéquat de la ration du chien de traîneau pouvait se définir selon les proportions de matière sèche représentées sur la Figure 10.



*Figure 10 : Répartition des macronutriments (en pourcentage de matière sèche) dans une ration idéale en compétition : 22 à 40 % de lipides, 10 à 25 % d'extrait non azoté et 37 à 42 % de protéines (Taleux 2019)*

Il est également important que les aliments apportés soient de bonne qualité, et que les protéines soient hautement digestibles, afin d'assurer leur bonne absorption et métabolisation par l'organisme.

Malgré une très bonne adaptation de l'organisme des chiens de traîneau à la course, et même si les mushers veillent à assurer une alimentation et un entraînement adaptés, il arrive que les chiens se blessent ou déclarent une maladie lors de courses d'entraînement ou de compétition. Nous allons détailler au cours de la partie suivante, les principales affections des chiens de traîneau, ainsi que leurs facteurs favorisants.

## E. Principales affections des chiens de traîneau

Les courses de chiens de traîneau sont un sport singulier, qui nous l'avons vu, se pratique dans des conditions parfois extrêmes, et qui nécessite un effort intense fourni par les mushers et leurs chiens. Ces exigences impliquent une prise de risque, ainsi qu'une fatigue à la fois psychique et physique, qui peuvent être à l'origine de blessure ou de maladie chez les chiens de traîneau. Nous allons détailler dans cette partie les affections que peuvent développer les chiens de traîneau lors d'une course.

## 1. Les affections musculo-squelettiques

Avant tout, le chien de traîneau est un sportif, et le travail fourni lors d'une course est principalement musculaire. C'est ainsi que les contractions répétées et intense des muscles, ainsi que les mouvements répétés des articulations, peuvent parfois aboutir à des affections des structures musculo-squelettiques.

### i. Les affections musculaires

Tout d'abord les affections musculaires peuvent être douloureuses mais non lésionnelles, comme les contractures et les crampes.

En 2008 les crampes représentaient 6% des affections des chiens de traîneau de la LGO, et étaient principalement décrites lors des 100 premiers kilomètres de course, et possiblement en lien avec un manque d'entraînement (Rebert 2010). La crampe et la contracture sont respectivement des contractions involontaires de courte et de longue durée d'un muscle ou d'un groupe de muscle. Une crampe peut se résoudre rapidement avec l'étirement du muscle. L'acidose musculaire est un facteur prédisposant à l'apparition des contractures et des crampes, et peut être la conséquence d'un manque d'entraînement, d'un mauvais échauffement ou encore d'une déshydratation (Fouriez-Lablée 2004). Les contractures et les crampes peuvent être traitées par des étirements passifs, mais également par le repos, et l'application de chaleur.

Les chiens de traîneau peuvent également présenter de véritables lésions musculaires lors de courses, comme les contusions, les élongations, les claquages, les déchirures et les ruptures musculaires.

Les contusions correspondent à un œdème et hématome du tissu musculaire, liés à un choc sur le muscle à l'effort. Elles peuvent nécessiter la mise en place d'une cryothérapie et physiothérapie, ainsi que le respect d'une période de repos.

L'élongation, le claquage, la déchirure et la rupture correspondent à des degrés différents de lésions d'étirement du muscle, lorsque celui-ci dépasse ses capacités élastiques au cours de l'effort :

- L'élongation correspond à la rupture de quelques myofibrilles, et entraîne une diminution de la capacité contractile du muscle
- Le claquage est la rupture de plusieurs fibres musculaire, à l'origine d'une hémorragie musculaire localisée, et d'une incapacité immédiate et totale du muscle concerné à se contracter. La cicatrisation permet une reconstitution *ad integrum* du tissu musculaire
- La déchirure correspond à un claquage avec une désorganisation du tissu conjonctif de soutien du muscle, ce qui implique une cicatrisation longue et parfois incomplète

- La rupture est une déchirure totale du muscle. L'ensemble du tissu musculaire est désorganisé, et il y a apparition d'un hématome volumineux. Le plus souvent cette rupture a lieu au niveau de la jonction musculo tendineuse

Enfin La douleur provoquée par les déchirures des myofibrilles, est intense et brutale au cours de l'effort, et peut conduire à l'incapacité à utiliser le muscle touché. Du repos est alors obligatoire pour limiter la douleur et favoriser la réparation des tissus déchirés, la durée de ce repos est à adapter en fonction de la gravité de la lésion. Il est aussi possible de réaliser une compression du muscle avec un bandage, ainsi qu'une cryothérapie, une hydrothérapie et une physiothérapie (Fouriez-Lablée 2004).

Il existe une autre affection qui peut toucher les chiens de traîneau fournissant un effort intense ou de longue durée : la rhabdomyolyse d'effort. Elle consiste en une nécrose massive des cellules musculaires, et la libération de nombreuses molécules et ions intracellulaire dans le sang. Les facteurs favorisants actuellement mis en évidence sont les coups de chaleurs, des crampes liées à une hyperthermie musculaire, des désordres de la glycolyse et du métabolisme des acides gras, des dysfonctions mitochondriales et des myopathies dystrophiques (Fernandes, Davenport 2019).

Cette affection peut avoir des conséquences dramatiques sur la fonction rénale et peut conduire à la mort du chien, par accumulation de la myoglobine dans les tubules rénaux. Elle peut également entraîner une hyperkaliémie sévère, ainsi qu'une coagulation intravasculaire disséminée (Rebert 2010).

Il est donc fondamental d'effectuer un diagnostic précoce de cette affection, en étant attentif à des signes cliniques tels qu'une fatigue musculaire inhabituelle, des trémulations musculaires, des syncopes ou de la dyspnée. Pour confirmer le diagnostic il est possible d'avoir recours à un examen de biochimie sanguine. Le facteur biochimique le plus précoce pour détecter une rhabdomyolyse d'effort est l'augmentation de la créatinine kinase plasmatique, d'environ un facteur 30 par rapport aux valeurs usuelles chez le chien (Devall et al. 2018).

Les efforts musculaires répétés et intenses peuvent également être à l'origine de tendinites, qui sont une inflammation du tendon, et de téno-synovites, qui sont une inflammation du tendon et de sa gaine synoviale (Rebert 2010). Ces deux affections se soignent également par une période de repos stricte, de la cryothérapie, la prise d'anti-inflammatoire et de la physiothérapie.

Les chiens de traîneau peuvent enfin développer des fractures osseuses, appelées fractures « de fatigue », liées à un dépassement des capacités de résistance à l'extension ou à la compression des os, notamment lors d'effort répétés, ou trop intenses, en lien avec un surentraînement. La fatigue musculaire peut également favoriser ce type de fracture, puisque les muscles fatigués ne permettent pas une absorption optimale des chocs, qui vont alors d'avantage se répercuter sur les tissus osseux.

## *2. Les affections gastro-intestinales*

Les courses de chiens de traîneau ont également un fort impact sur le tube digestif, principalement du fait de modifications de la perfusion sanguine des organes, des changements de ration alimentaire, et des chocs répétés provoquant des mouvements des organes au sein de la cavité abdominale.

Les chiens de traîneau développent très fréquemment des affections gastro-intestinales au cours de compétition. Par exemple au cours de l'édition 2008 de la LGO, 15% des chiens ont développé au moins un épisode de diarrhée pendant la course (Rebert 2010). Une autre étude menée chez des chiens courant la course de l'Iditarod a permis de mettre en évidence via des endoscopies, la présence d'ulcères gastriques chez 48,5% des chiens, ce qui était significativement plus élevé que les résultats obtenus chez un groupe témoin. Ces affections sont donc très présentes chez le chien de traîneau, et sont considérées comme la première cause de mort subite du chien de traîneau, par induction de vomissements qui entraînent des fausses déglutitions mais également par hémorragie en lien avec une ulcération gastrique (Davis et al. 2003). Ces affections gastro-intestinales peuvent mener à une anorexie et une déshydratation, qui altèrent encore davantage l'état clinique et les capacités sportives des chiens (Rebert 2010).

Chez l'homme les lésions gastro-intestinales ont été reportées principalement chez des athlètes ayant parcouru de longues distances. Il a été montré que le principal mécanisme physiopathologique à l'origine de ces lésions était l'ischémie intestinale transitoire provoquée par l'effort. Les autres facteurs favorisants minoritaires étant les lésions mécaniques et les changements alimentaires. Chez l'homme, pour un même exercice, les conséquences circulatoires de l'exercice sont très variables d'un individu à l'autre, et peuvent aller d'une discrète diminution de la circulation splanchnique à une ischémie sévère de tout le tractus digestif avec une diminution du flux sanguin pouvant atteindre 80% (de Oliveira, Burini, Jeukendrup 2014). Cette ischémie peut être également aggravée par la déshydratation lors de l'effort. Nous pouvons supposer qu'il existe de telles variations individuelles chez le chien, d'autant plus que différentes races sont présentes sur la course. Les répercussions de l'ischémie peuvent être des lésions épithéliales à l'origine d'ulcère ou de modifications des fonctions et de la perméabilité de la barrière épithéliale. Ces lésions peuvent provoquer des symptômes tels que des douleurs abdominales, des vomissements, de l'anorexie, de la diarrhée (de Oliveira, Burini, Jeukendrup 2014).

De plus, différents facteurs favorisant les diarrhées ont pu être mis en évidence chez le chien de traîneau au cours d'une compétition. Le stress physique et psychologique tout d'abord, en favorisant la libération du Corticotropin-releasing Factor, entraîne une augmentation de la motilité du colon, ainsi qu'une hyperalgésie viscérale (Taché, Million 2015). On appelle cela le phénomène de « stress-diarrhée-déshydratation », bien décrit chez le chien de traîneau. En effet, la diarrhée peut entraîner une déshydratation extracellulaire, qui peut à son tour accentuer la diarrhée par diminution de la perfusion intestinale. Il a été montré qu'un manque d'entraînement et une neige « glacée » ou « lourde » étaient susceptibles d'induire un stress supplémentaire chez les chiens de traîneau (Rebert 2010).

Pour le traitement des diarrhées, il est possible de donner du psyllium qui joue le rôle de prébiotique et de mucilage permettant d'absorber l'eau dans l'intestin et de limiter ainsi les symptômes de diarrhée. Il est également possible de donner de la smectite et des probiotiques aux chiens de traîneau pour atténuer la diarrhée (Taleux 2019).

### *3. Les autres affections fréquemment rencontrées chez le chien de traîneau*

D'autres affections sont fréquemment rencontrées chez les chiens de traîneau pendant une compétition. Parmi elle on retrouve :

#### ❖ L'hyperthermie d'effort :

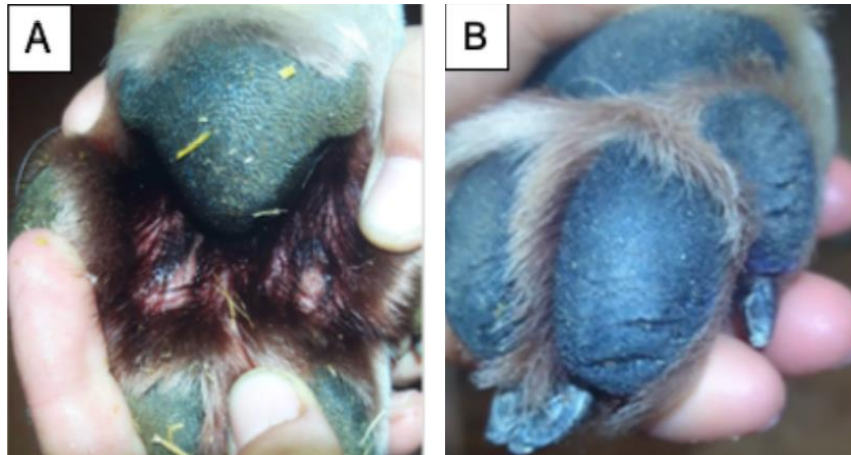
Lors d'un exercice, 75% de l'énergie utilisée par le muscle est dissipée sous forme de chaleur. Cette forte production de chaleur peut devenir délétère lorsque la thermorégulation de l'organisme n'arrive plus à maintenir une température corporelle physiologique. Cela dépend fortement de la température extérieure, puisqu'il a été montré que chez le chien de traîneau, la thermorégulation n'était plus assez efficace lors de courses par des températures supérieures à 10°C, lors desquelles les chiens risquent ce qu'on appelle un « coup de chaleur ». L'hygrométrie influence également les capacités thermorégulatrices du chien, puisqu'une hygrométrie élevée limite le volume d'eau expiré par halètement, qui est une stratégie essentielle de la thermolyse chez le chien. Au-delà de 43°C de température corporelle, l'animal est en état de choc, et des lésions tissulaires apparaissent. Il a également été montré qu'un entraînement correctement mené permettait de limiter les hyperthermies d'effort en compétition (Rebert 2010).

Nous avons également vu précédemment que l'hyperthermie musculaire était un facteur favorisant les lésions musculaires, et notamment les rhabdomyolyses d'effort.

#### ❖ Les affections podales :

Il existe deux lésions principales affectant les pattes des chiens lors d'une course : les dermites interdigitées et les blessures traumatiques des coussinets (Figure 11).





*Figure 11 : Photos de pattes de chiens de traîneau présentant une affection podale : une dermatite interdigitée (A) et des crevasses (B) (Sigogneau 2019)*

Les dermites interdigitées sont causées par les frottements interdigités lors de la course, mais également par l'accumulation de neige entre les doigts, qui favorisent l'inflammation voire l'ulcération de la peau dans cette zone, et peut entraîner des pyodermites secondaires (Rebert 2010). Lors de l'édition 2019 de la LGO, sur 61 chiens étudiés, 23,4% présentaient une dermatite interdigitée (Sigogneau 2019). Le traitement repose notamment sur l'utilisation de pommades cicatrisantes et antiseptiques, et si les lésions sont profondes ou infectées, il est parfois nécessaire que le chien observe une période de repos, et un traitement antibiotique peut éventuellement être mis en place.

Les blessures traumatiques de coussinets sont des ruptures ou des coupures franches des coussinets, causées principalement par les frottements des coussinets sur la neige et la glace ou d'autres éléments abrasifs. 17,5% des chiens étudiés lors de la LGO 2019 présentaient de telles lésions (Sigogneau 2019). Le traitement consiste à désinfecter et à protéger la plaie avec des pommades ou des pansements selon la gravité de la lésion. Si les plaies sont profondes et infectées, un traitement antibiotique par voie orale, ainsi qu'une période de repos doivent être initiés.

#### ❖ Les affections respiratoires :

La course par temps sec et froid peut favoriser la trachéite non infectieuse, qui peut se résoudre spontanément, ou peut dans les cas les plus graves nécessiter des anti-inflammatoires et du repos (Rebert 2010). La présence de nombreux chiens sur la course peut également favoriser la diffusion d'agents pathogènes provoquant une toux de chenil, et ce malgré la vaccination, qui ne permet pas de protéger contre tous les agents de cette maladie. Dans ce cas il est important de mettre le chien au repos, et de lui administrer des antibiotiques si nécessaire.

Enfin, il est très fréquent que les chiens de traîneau fassent des pneumonies par fausse déglutition pendant la course. Cela signifie que du contenu digestif transite dans l'arbre respiratoire. Ce phénomène est souvent la conséquence d'affections digestives hautes telles que les gastrites, qui induisent des vomissements pendant la course. Il est impossible que le chien s'arrête pour vomir pendant la course, ainsi la tachypnée au moment du vomissement rend la probabilité que le contenu digestif puisse aller dans les poumons très élevée.

Cette première partie nous a permis d'étudier le déroulement des compétitions de chiens de traîneau, et plus particulièrement celui de la Grande Odyssée Savoie Mont Blanc. Nous avons également abordé la physiologie musculaire des chiens de sport et enfin les principales affections développées par les chiens de traîneau pendant les courses de compétitions.

Dans le cadre de notre étude visant à étudier le stress oxydatif chez le chien de traîneau, nous allons détailler dans la partie suivante le stress oxydatif, ses causes et ses conséquences sur l'organisme. Nous étudierons également en quoi les chiens de traîneau sont prédisposés à développer un stress oxydatif lors d'un exercice, et quels sont les outils thérapeutiques à notre disposition pour limiter ce stress oxydatif.

## II. Le stress oxydatif

### A. Notion de stress et définition du stress oxydatif cellulaire

Le stress se définit comme tout stimulus intrinsèque ou extrinsèque provoquant une réponse de l'organisme. En fonction de la nature, de la durée et de l'amplitude du stimulus, la réponse au stress provoque des effets variés sur l'organisme. Il a été montré qu'un organisme vivant dans un environnement stressant était plus susceptible de déclencher certaines maladies (Yaribeygi et al. 2017).

Dans notre étude nous allons nous intéresser plus particulièrement au stress oxydatif. Celui-ci se définit comme une forme particulière de stress, caractérisé par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène, et leur élimination par les défenses antioxydantes, ce qui aboutit à leur accumulation au sein de la cellule. Nous utiliserons par la suite l'abréviation ROS qui signifie *Reactive Oxygen Species*, très utilisée dans la littérature scientifique pour parler des espèces réactives de l'oxygène.

Le déséquilibre à l'origine du stress oxydatif peut survenir dans deux situations (Grandjean 2001) :

- ❖ Lorsque la proportion d'agents antioxydants diminue au sein de la cellule
- ❖ Lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène devient trop importante et dépasse les systèmes de régulation antioxydants.

Depuis la découverte des radicaux libres vers le milieu des années 50 par Gerschman et Hartman, de nombreuses recherches ont permis de mettre en évidence la capacité des ROS à générer des dommages oxydatifs aux macromolécules tels que l'ADN, les lipides et les protéines et ainsi à provoquer de nombreuses maladies. C'est pourquoi le stress oxydatif est aujourd'hui un sujet majeur de recherches dans les domaines de la médecine humaine et de la médecine vétérinaire (Haleng et al. 2007).

Nous allons par la suite décrire les origines du stress oxydatif, ses composantes biologiques, ses rôles dans l'organisme, ainsi que ses effets délétères sur les cellules puis plus généralement sur l'organisme. Enfin nous aborderons les différents moyens de lutte contre le stress oxydatif que nous avons aujourd'hui à notre disposition en médecine vétérinaire.

## B. Origine du stress oxydatif

### 1. Structure et propriétés de la molécule d'oxygène O<sub>2</sub>

La molécule d'O<sub>2</sub>, présente à 20,95% dans l'air que nous respirons, est essentielle au métabolisme cellulaire, et donc à la survie de tout être vivant. Pour tous les mammifères, celle-ci est inspirée puis subit une diffusion alvéolo-capillaire passive. Elle est ensuite transportée dans le sang sous forme dissoute ou bien liée aux molécules d'hémoglobines au niveau de l'hème. Grâce à l'appareil circulatoire et à son réseau capillaire, la molécule d'oxygène va pouvoir atteindre toutes les cellules de l'organisme.

La molécule d'oxygène est un biradical car elle porte deux électrons non appariés sur sa couche électronique supérieure, représentés par les • dans la Figure 12 et les traits - représentent des paires d'électrons.

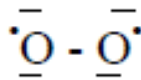
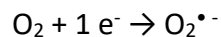


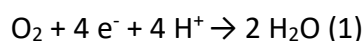
Figure 12 : Structure de Lewis de l'oxygène moléculaire (JUNGLUTH G., 2008)

Cette conformation fait que la molécule d'oxygène est un bon oxydant. Elle peut aisément acquérir un électron supplémentaire, conduisant à la formation du radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> selon la réaction de réduction suivante :



Dans la cellule, environ 2 à 5 % (Jackson 2000) de l'oxygène subit cette réaction, qui est catalysée par l'enzyme ubiquinone – ou coenzyme Q - de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le radical superoxyde peut à son tour générer d'autres ROS par des réactions que nous étudierons dans la suite de notre travail (Migdal, Serres 2011).

Les autres molécules d'oxygène entrent dans la chaîne respiratoire mitochondriale, où elles subissent une réduction tétravalente - c'est-à-dire l'addition de 4 électrons - amenant à la production d'eau selon la réaction (1). Cette réaction est catalysée par le cytochrome c oxydase - enzyme du complexe IV - de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (Gardès-Albert, Bonnefont-Rousselot, Abedinzadeh 2003).



La molécule d'oxygène possède une conformation qui lui confère la possibilité d'accepter un électron et ainsi devenir une espèce réactive : le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ce dernier est très instable et peut générer d'autres ROS. La partie suivante va nous permettre d'étudier l'origine, les propriétés et les conséquences biologiques des ROS dans la cellule.

## 2. Formation d'entités réactives de l'oxygène

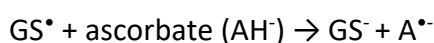
Les espèces réactives de l'oxygène sont des espèces hautement instables, qui existent un temps très court, de l'ordre de la microseconde, dans la cellule. Elles peuvent réagir entre elles mais aussi avec de nombreuses biomolécules, ce qui peut avoir pour conséquence la génération d'autres ROS ainsi que l'altération de ces biomolécules.

Les ROS peuvent être séparés en deux groupes : les espèces non radicalaires et les espèces radicalaires.

Un radical est une molécule ou un atome possédant un électron non apparié. Souvent l'association de cet électron avec un autre électron porté par un autre atome est un processus énergétiquement favorable, permettant de combler l'orbital atomique du radical et de former une liaison covalente. Les électrons s'associant sur un même orbitale pour former une liaison doivent être de spin opposé selon le principe d'exclusion de Pauli. Le spin est une caractéristique quantique des électrons intimement liée à leurs propriétés de rotation. Le spin des électrons peut être représenté avec des flèches, et l'association de 2 électrons pour former une liaison covalente peut être représenté de la façon suivante :



Ainsi la plupart des radicaux réagissent dès qu'ils rencontrent une molécule, radicalaire ou non, pouvant apporter cet électron. Ces réactions sont des réactions d'oxydoréduction, lors desquels le radical est réduit et la molécule avec laquelle il réagit est oxydée. Voici l'exemple de l'oxydation de l'ascorbate, forme soluble de la vitamine C, par le radical thiyl GS<sup>•</sup> (Asmus 2000) :



### i. Les principales espèces non radicalaires

#### a. L'oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

A l'état fondamental l'oxygène est dans un état qualifié de triplet ou biradical, et noté <sup>3</sup>O<sub>2</sub>. Cela signifie que ses 2 électrons célibataires ont la même direction de spin  $\uparrow^{\bullet}\text{O} - \text{O}^{\bullet}\uparrow$  et ne peuvent pas réagir entre eux, mais peuvent réagir avec d'autres molécules en présence de catalyseurs susceptibles d'activer l'oxygène ou les molécules organiques, en modifiant leurs populations d'électrons périphériques. Cet état est l'état le plus stable de l'oxygène.

Dans l'organisme, l'oxygène triplet peut être converti en oxygène singulet, qui est un état instable et excité de l'oxygène noté  $^1O_2$ , dans lequel tous les électrons de sa couronne externe sont appariés sur une même orbitale dite antiliante, et de spins opposés. Un apport d'énergie est nécessaire à ce changement de configuration électronique (Miyamoto et al. 2014). L'oxygène singulet est hautement réactif, environ 1500 fois plus que son état fondamental  $^3O_2$ , et peut ainsi réagir avec de nombreuses biomolécules comme les lipides, les protéines et l'ADN (Koh, Fluhr 2016).

Il est formé par de très nombreuses réactions au sein de la cellule, illustrées dans la Figure 13, et par différents systèmes enzymatiques tels que la lactoperoxydase, la myéloperoxydase, la catalase et la NADPH oxydase. Il peut également être formé par photosensibilisation, suite à l'exposition des cellules au UV A et UV B principalement.

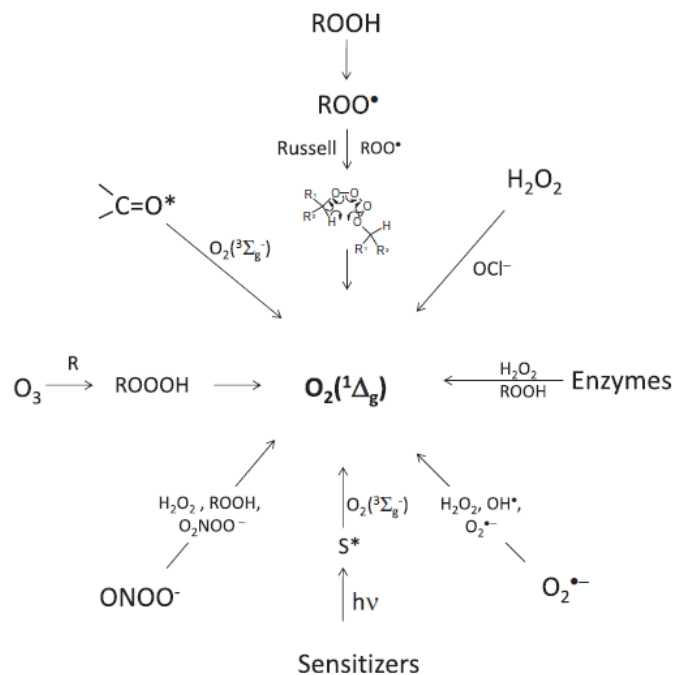
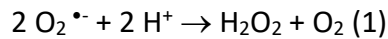


Figure 13 : Principales réactions biochimiques à l'origine de la production de  $^1O_2$  (Miyamoto et al. 2014)

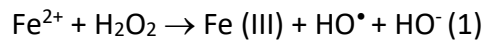
Il est capable d'engendrer d'importantes lésions cellulaires et notamment des réactions d'oxydation au niveau des doubles liaisons des bases azotées de l'ADN et former le 8-oxo-7,8-dihydrodésoxyguanosine, molécule dosable en laboratoire afin d'évaluer les dégâts cellulaires liés au stress oxydatif. Il a été montré qu'un excès d'oxygène singulet avait un pouvoir mutagène et était impliqué dans des maladies telles que la cataracte et les cancers de la peau chez l'homme (Sies 1993).

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

Le peroxyde d'hydrogène est une molécule relativement stable pouvant exister plusieurs minutes dans la cellule. Le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est produit majoritairement dans la mitochondrie, dans laquelle on retrouve 11 sites catalysant sa formation (Brand 2016). La principale réaction de production (1) que nous citerons est celle catalysée par la superoxyde dismutase à partir du radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, et dont voici l'équation (Cadenas, Davies 2000):



Le peroxyde d'hydrogène n'est pas très réactif en soi, mais peut donner naissance, via la réaction de Fenton (1), au radical hydroxyle, qui est lui-même l'oxydant le plus puissant des ROS (Migdal, Serres 2011) :



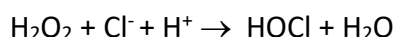
L'existence de la réaction de Fenton dans les systèmes biologiques est donc dépendante de la présence de Fer libre – noté LM-Fe – dans les cellules. Or l'existence de ce Fer libre est peu probable car hautement régulé par les chélateurs du Fer, abondants dans l'organisme et que nous détaillerons dans la suite de ce travail. Nous verrons donc que la réaction de Fenton peut survenir lors de certaines conditions pathologiques faisant suite à un exercice par exemple.

Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir pour former l'anion hypochlorite dont nous parlerons dans paragraphe suivant.

### c. L'acide hypochloreux HOCl

L'acide hypochloreux HOCl est une molécule instable, capable de réagir avec de nombreuses biomolécules, parmi lesquelles : les protéines à groupement thiol (Hazell, van den Berg, Stocker 1994), à groupement amine (Thomas 1979), l'ADN et l'ARN, l'acide ascorbique et les acides gras insaturés (Prütz 1996).

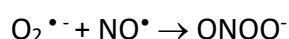
L'acide hypochloreux est produit par les myéloperoxydases des neutrophiles et monocytes selon la réaction suivante (Deaton, Marlin 2003):



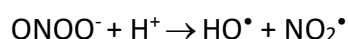
#### d. Le peroxy-nitrite $\text{NO}_3^-$

Le peroxy-nitrite  $\text{NO}_3^-$  est une espèce hautement réactive de l'oxygène ayant un temps de demi-vie long comparativement aux autres ROS (Deaton, Marlin 2003) et peut ainsi diffuser au travers des membranes et exercer ses effets à distance. L'étude de J. Beckman *et al.* a permis de mettre en évidence l'oxydation des désoxyriboses de l'ADN par le peroxy-nitrite.

Il est formé par la réaction rapide de l'oxyde nitrique  $\text{NO}^\bullet$  avec le radical superoxyde, selon l'équation de réaction suivante :



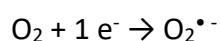
En milieu acide le peroxy-nitrite peut également mener à la formation du puissant radical  $\text{HO}^\bullet$  selon la réaction (Beckman, Freeman 1990) :



### ii. Les principales espèces radicalaires

#### a. L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$

Comme nous l'avons vu précédemment, dans les conditions physiologiques environ 2% de l'oxygène est réduit en radical superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet -}$  par le coenzyme Q dans la chaîne respiratoire mitochondriale, selon la réaction de réduction suivante :



Il est également produit par les NADPH-oxydases, enzyme présente dans tous les tissus de l'organisme, par la réaction (1). Cette enzyme est présente en grande quantité dans les phagocytes, où elle revêt un rôle immunitaire important car l'anion superoxyde entre en jeu dans la lutte contre les agents infectieux.

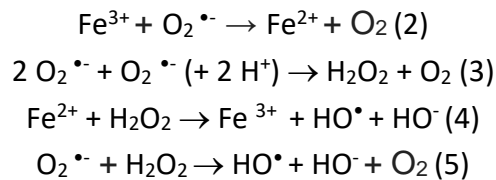


Le radical superoxyde réagit peu avec les macromolécules (Bedard, Krause 2007). L'importance du superoxyde dans le stress oxydatif cellulaire vient surtout de son rôle à produire les réactifs de la réaction de Fenton, qui elle-même produit le puissant radical hydroxyle  $\text{HO}^\bullet$ .

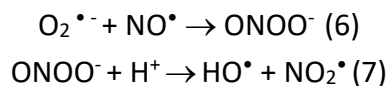
- L'anion superoxyde permet de libérer du fer, en réagissant avec les ferroprotéines comme la ferritine (Halliwell 2012) et permet aussi la réduction de l'oxyde ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en oxyde ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  (2).
- Il assure également la formation de peroxyde d'hydrogène par la réaction (3).



L'oxyde ferreux et le peroxyde d'hydrogène sont les réactifs de la réaction de Fenton (4) dont nous avons parlé précédemment. La combinaison des étapes (2) et (4) aboutit à la réaction d'Haber Weiss (5), catalysée par un cation métallique tel que le Fe<sup>3+</sup>, et qui produit le puissant radical hydroxyle :



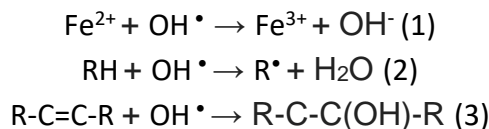
Enfin, le superoxyde permet également la formation du peroxydinitrite (6), qui a son tour peut réagir pour former le radical hydroxyle (7) (Deaton, Marlin 2003) :



#### b. Le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>

Le radical hydroxyle est le radical le plus puissant des ROS. Il réagit de façon très rapide avec toutes les biomolécules (moins d'une microseconde après sa production). Il n'a donc pas le temps de diffuser et réagit à proximité de la membrane mitochondriale. Comme nous l'avons vu précédemment, le radical hydroxyle est produit via la réaction d'Haber Weiss, et également par la fission homolytique du peroxydinitrique.

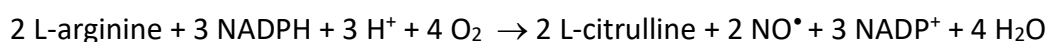
Sa réaction avec les biomolécules se fait selon 3 modalités : en arrachant un électron (exemple avec l'oxydation du fer (1)), en arrachant un atome d'hydrogène (2) ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (3) (Gardès-Albert, Bonnefont-Rousselot, Abedinzadeh 2003) :



Dans la suite de ce travail, nous détaillerons les réactions d'altération de l'ADN, des acides aminés et des acides gras polyinsaturés par le radical hydroxyle, ainsi que leurs conséquences pour la cellule.

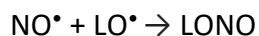
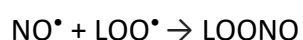
### c. L'oxyde nitrique NO•

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote NO•, est un radical très réactif, produit à partir de la L-arginine par différents isoformes de l'enzyme oxyde nitrique synthases selon la réaction suivante :



Ce radical possède la propriété de très bien diffuser à travers les membranes, et cela contribue à faire de lui un très bon messager paracrine. Il a plusieurs fonctions biologiques dans l'organismes dont ceux de neurotransmetteur, d'agent vasodilatateur, d'inhibiteur d'agrégation plaquettaire, d'agent de lutte contre les microorganismes et de messenger cellulaire pour la synthèse des protéines (Forstermann, Sessa 2012). Il a aussi été montré que le NO• jouait un rôle essentiel dans les cellules des fibres musculaires squelettiques, dans lesquelles il permet une entrée de glucose lors d'un exercice. Le mécanisme à l'origine d'une augmentation de l'activité des oxyde nitrique synthases pendant l'effort n'a pas encore été totalement élucidé (Kellogg et al. 2017). Lors d'un effort, il y a donc une augmentation de la quantité de NO• dans les muscles squelettiques.

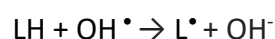
Le NO• est à la fois un agent antioxydant et pro-oxydant. Ses propriétés antioxydantes viennent de sa capacité à stopper les chaînes de peroxydations lipidiques que nous détaillerons dans la suite de notre travail, selon les réactions suivantes (Cillard, Cillard 2006) :



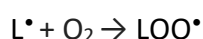
Mais il a été montré que lors d'un stress oxydatif, ce sont les propriétés pro-oxydantes du NO qui prédominaient via sa capacité à réagir avec le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former l'anion peroxynitrite NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et le radical NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, eux-mêmes très réactifs.

### d. Les radicaux peroxydes LOO•

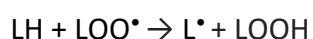
Les radicaux peroxydes peuvent être générés par réaction du radical hydroxyle avec un acide gras polyinsaturé. De manière plus générale, tout radical suffisamment puissant peut réagir avec un groupe méthylène d'un acide gras polyinsaturé de la façon suivante :



Puis une molécule d'oxygène vient rapidement se lier au radical carboné :



Le radical peroxyde peut alors réagir avec d'autres acides gras polyinsaturés selon une réaction dite de propagation :





Certains organes vont être plus touchés que d'autres par le stress oxydatif, et cela en fonction des nutriments qu'ils métabolisent. Par exemple dans le muscle, un apport excessif en lipides, en glucose et en protéines, provoque un déséquilibre rédox de la cellule musculaire par surcharge du cycle de Krebs, accumulation de lipides dans la cellule, augmentation des voies parallèles du métabolisme glucidique, et un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. La Figure 15 ci-dessous résume les principaux organes touchés par le stress oxydatif faisant suite au métabolisme de certains nutriments.

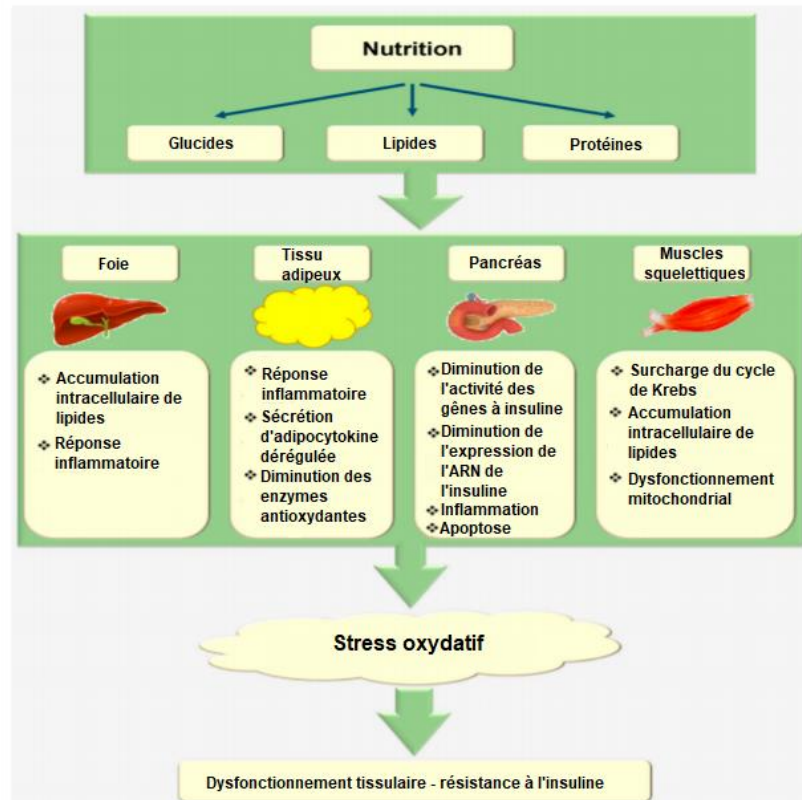


Figure 15 : Principaux organes touchés par le stress oxydatif suite au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines (Saha et al. 2017)

Une étude menée sur 21 chiens semble montrer qu'un apport excessif en acides gras polyinsaturés est à l'origine d'un stress oxydatif, mis en évidence par l'augmentation du taux de peroxydations lipidiques (Walters et al. 2010)

#### b. Les autres sources exogènes

D'autres sources exogènes peuvent être à l'origine d'un apport en ROS ou bien d'une augmentation de leur production par les cellules de l'organismes.

La pollution atmosphérique est aujourd'hui un sujet de préoccupation majeure, et l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'elle provoque la mort de 7 millions de personnes par an. Une étude a aussi montré que 9 personnes sur 10 dans le monde respirent un air avec des niveaux élevés de polluants (World Health Organization 2018). En tant qu'animal de compagnie, une grande partie des chiens dans le monde respirent donc un air pollué. De nombreuses études chez l'homme ont permis de mettre en évidence un lien entre la pollution atmosphérique et le remodelage des bronches et du parenchyme pulmonaire. Les principaux polluants identifiés sont l'Ozone O<sup>3</sup> ainsi que les micro et nanoparticules, appelées aussi « particules fines ». Ces particules sont composées de composés organiques et carbonés et de métaux de transition comme le fer et le cuivre.

Ces polluants induisent un stress oxydatif au niveau pulmonaire selon 4 mécanismes :

- Les composés organiques induisent une production de ROS par les macrophages et les cellules épithéliales bronchiques,
- L'ozone diffuse jusqu'aux alvéoles et y oxyde les biomolécules du surfactant, comme les acides gras polyinsaturés, dont la réactivité peut ensuite générer d'autres ROS (Baeza, Marano 2007),
- Par induction d'une forte inflammation du parenchyme pulmonaire, avec une arrivée massive de polynucléaires neutrophiles et de macrophages, générant des ROS,
- Par apport de métaux de transition pro-oxydant,

Le stress oxydatif provoqué par ces polluants va être à l'origine de l'apoptose des cellules de l'appareil respiratoire, et d'un remodelage bronchique notamment à l'origine de maladie respiratoire chronique (Clarke et al. 2000). Chez le chien cette modification de structure a été montrée avec la fumée de cigarette, qui peut être un facteur aggravant des bronchite chronique (Yamaya, Sugiya, Watari 2015).

Les rayonnements ultra-violets (UV) sont des rayonnements solaires de plus haute énergie que la lumière visible. Ils peuvent être à l'origine de la production de ROS par les cellules de l'épiderme, ainsi que d'un phénomène inflammatoire cutané. De nombreuses études ont permis de faire un lien entre les rayonnements UV, le stress oxydatif qu'ils induisent, et les principales tumeurs cutanées (D'Orazio et al. 2013). Ils ont également des effets délétères au niveau des structures oculaires où il a été mis en évidence qu'ils génèrent un stress oxydatif à l'origine de diverses affections comme la cataracte et le glaucome (Ivanov et al. 2018).

Il existe d'autres facteurs exogènes à l'origine d'un stress oxydatif, tels que les pesticides (Abdollahi et al. 2004), ou les rayonnements ionisants produits par exemple lors d'expositions à la radioactivité ou lors de la réalisation de radiographies médicales (Azzam, Jay-Gerin, Pain 2012).

#### iv. Principales sources endogènes

##### a. La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organe cellulaire présent dans toutes les cellules de l'organisme des mammifères. Elle possède une double membrane, délimitant un espace intermembranaire et un compartiment matriciel. Elle est essentielle au métabolisme cellulaire, et sa principale fonction est la transformation de l'énergie des nutriments, dont les glucides et les acides gras, en énergie utilisable par la cellule : l'ATP (Kudryavtseva et al. 2016).

Elle revêt également de nombreuses autres fonctions, comme le contrôle de la sénescence cellulaire via des protéines régulatrices de l'apoptose, les Bcl-2 (Wang, Youle 2009).

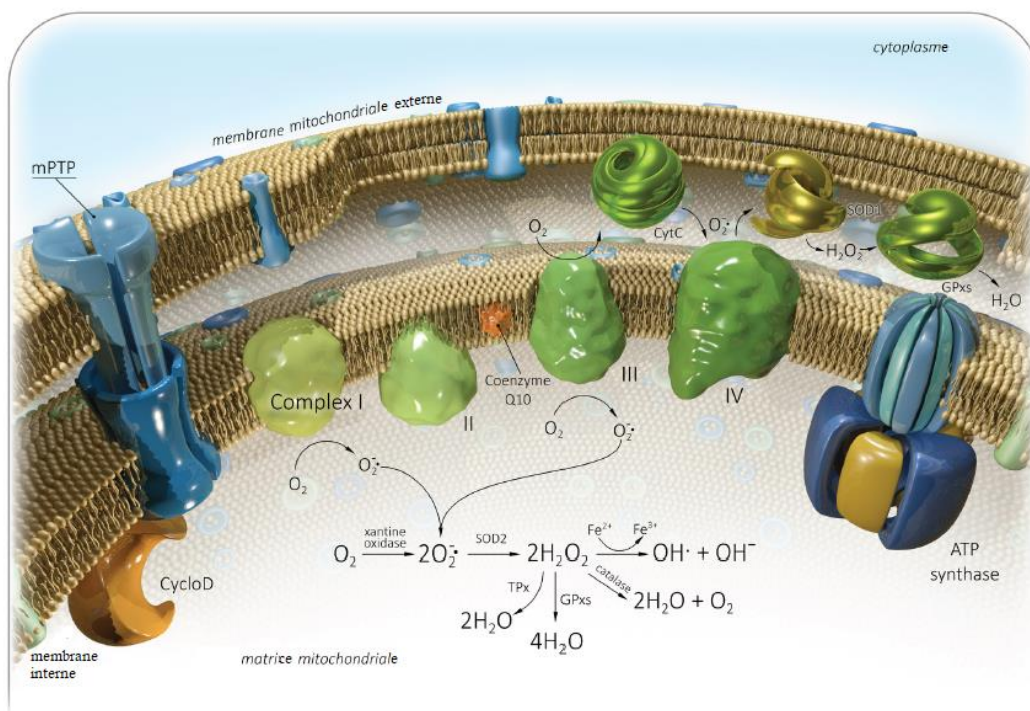


Figure 16 : Génération d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie (Kudryavtseva et al. 2016)

La mitochondrie possède une chaîne respiratoire mitochondriale, qui est composée de 4 complexes protéiques insérés dans sa membrane interne et capables de réaliser des réactions d'oxydoréduction (Figure 16). Un transfert d'électron se fait entre chaque complexe, via le coenzyme Q et le cytochrome C qui jouent le rôle d'accepteur puis de donneur d'électron.

Ces réactions d'oxydoréduction aboutissent à la formation d'un gradient de proton de part et d'autre de la membrane interne, qui va permettre à l'ATP synthase de synthétiser de l'ATP.

Parmi ces complexes protéiques, il a été montré que les complexes I et III génèrent des ions superoxydes en conditions physiologiques (Andreyev, Kushnareva, Starkov 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, 2 à 5% de l'oxygène qui entre dans la chaîne respiratoire est partiellement oxydé, c'est-à-dire converti en ion superoxyde. Le radical superoxyde est ensuite rapidement réduit en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde oxyde dismutase. La mitochondrie participe donc à l'augmentation du taux de ROS dans la cellule, car nous avons vu que le peroxyde d'hydrogène peut facilement traverser la membrane mitochondriale pour aller dans le cytoplasme.

Outre la chaîne respiratoire, 9 enzymes produisant des ROS ont été mises en évidence dans la mitochondrie. Leur concentration est très variable d'un tissu à l'autre et d'une espèce à l'autre (Andreyev, Kushnareva, Starkov 2005).

## b. Les cellules de l'inflammation

Lors d'une inflammation, les cellules inflammatoires sont attirées vers le lieu de l'inflammation par chimiotactisme. Ce mécanisme repose sur un système de signaux cellulaires produits lorsqu'un agent pathogène est présent dans l'organisme ou encore lors de morts cellulaires – dans le tissu musculaire lors d'un effort intense par exemple. Les ROS jouent d'ailleurs un rôle important dans la signalisation à l'origine de l'inflammation (Deaton, Marlin 2003).

Certaines cellules de l'immunité comme les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, ainsi que les lymphocytes NK et T cytotoxiques, s'activent et assurent la destruction des éléments pathogènes grâce à 2 types de mécanismes : les mécanismes oxygène-indépendants et les mécanismes oxygène-dépendants. Ces derniers sont les plus importants pour la destruction de leur cible. Il a été montré qu'après l'activation de ces cellules inflammatoires par des antigènes, celles-ci présentaient une très forte augmentation de leur consommation en oxygène et produisaient une quantité importante de ROS dans les lysosomes, ce phénomène est appelé « explosion respiratoire ». Différents systèmes enzymatiques que nous détaillerons par la suite, participent à la production de l'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , du radical hydroxyle  $HO^{\cdot}$ , de l'oxygène singulet  $^1O_2$  et de l'oxyde nitrique NO. Ces systèmes enzymatiques sont composés par les NADPH oxydases, les myéloperoxydases et les NOS synthases (Raichvarg, Guenounou, Zenou 1981).

Les lysosomes contiennent des ROS, des nitrites, des modificateurs du pH, des enzymes et des complexes générateurs de pores membranaires, qui peuvent provoquer la mort cellulaire par destruction de sa membrane et par désorganisation des échanges. Au contact de cellules cibles, les cellules inflammatoires sont capables de libérer le contenu des lysosomes par un phénomène de dégranulation. Cela va provoquer la cytolysse des cellules cibles à proximité, mais ce mécanisme étant non spécifique, il peut induire de nombreux dégâts cellulaires collatéraux, notamment l'altération ou la nécrose de cellules non-cibles (Sacheck, Blumberg 2001).

### c. Les NADPH oxydases

On retrouve les NADPH oxydases – abrégées NOX dans la littérature scientifique – dans la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Il existe plusieurs isoformes de NOX, qu'on va retrouver en proportions variables selon le tissu dans lequel elles se trouvent. En revanche elles possèdent une fonction biologique commune qui est l'oxydation du NADPH en NADP<sup>+</sup>, en parallèle de la réduction de la molécule d'oxygène O<sub>2</sub> en ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, par transfert d'un électron à travers la membrane plasmique ou lysosomale selon la réaction suivante :

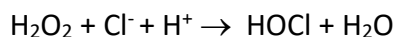


L'isoforme NOX 2 a été la première identifiée et la plus étudiée des NOX. Elle est fortement exprimée dans les polynucléaires et dans les macrophages, et contribue à « l'explosion respiratoire » dont nous avons parlé précédemment.

Les différents isoformes possèdent des fonctions physiologiques très variées, et sont fréquemment impliquées dans des phénomènes pathologiques consécutifs à la production de ROS. Certaines études montrent par exemple que NOX2 contribuerait à l'augmentation de la production de ROS dans le tissu musculaire strié au cours de l'effort (Bedard, Krause 2007).

### d. La myéloperoxydase

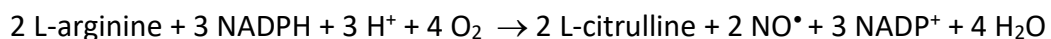
La myéloperoxydase est une enzyme présente dans les polynucléaires neutrophiles et dans les macrophages, participant à « l'explosion respiratoire » en catalysant la formation de l'acide hypochloreux, à fort pouvoir oxydant (Thomas 1979), selon la réaction :



Elle joue donc également un rôle clé dans la lutte contre les pathogènes.

### e. Les monoxydes d'azote synthétases (NOS)

Les monoxydes d'azote synthétase – abrégées NOS dans la littérature scientifique, pour « nitric oxide synthase » - permettent la synthèse du monoxyde d'azote NO<sup>•</sup>, en utilisant comme substrat l'oxygène et la L-arginine et comme co-substrat le nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate réduit (NADPH), selon la réaction suivante :





Il existe 3 isoformes de NOS, présents dans différents tissus de l'organisme. On retrouve la NOS I principalement dans les neurones, où le monoxyde d'azote joue un rôle dans la neurotransmission et dans le développement synaptique. Les NOS II, ou NOS inductibles, sont également présentes dans les cellules de l'immunité, où le NO• est produit suite à un stimulus inflammatoire, et a un effet cytotatique sur les agents pathogènes. Enfin on retrouve les NOS III en grand nombre dans les cellules endothéliales de l'organisme, où le NO• a un effet vasodilatateur (Forstermann, Sessa 2012).

#### f. Les métaux de transition

Un métal de transition est un métal dont la sous-couche électronique d est incomplète, ce qui leur permet d'établir de nombreuses liaisons avec d'autres atomes ou molécules. Les principaux métaux de transition ayant un rôle biologique dans l'organisme sont le fer (Fe), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le cobalt (Co) et le cuivre (Cu). Ils y sont précisément régulés, et n'existent en général pas sous leur forme libre, mais sous forme de complexes de faible poids moléculaires (Jenkins, Beard 2000). Nous nous intéresserons plus spécifiquement au fer de faible poids moléculaire dans ce paragraphe, car c'est le métal de transition qui semble avoir le rôle le plus important dans le phénomène de stress oxydatif. On retrouve le pool de fer de faible poids moléculaire – noté LM-Fe dans la littérature scientifique – dans les milieux intra et extracellulaires de l'organisme, lié à des phosphates inorganiques, des protéines, des lipides membranaires ou encore des acides organiques tels que le citrate. Il peut exister sous différents états d'oxydation et ses états les plus communs dans les systèmes organiques sont l'ion ferreux Fe<sup>2+</sup> et l'ion ferrique Fe<sup>3+</sup>.

Le fer influence fortement le statut redox des cellules en catalysant la formation du puissant radical hydroxyde par la réaction de Haber-Weiss que nous avons étudié précédemment :



La biodisponibilité du Fe<sup>2+</sup> dans une solution est influencée par le pH de la solution : plus le pH est acide plus le Fe<sup>2+</sup> va pouvoir catalyser certaines réactions comme celle d'Haber-Weiss. Or il a été montré qu'un effort musculaire diminue le pH cellulaire musculaire par la production d'acide lactique, et ce faisant augmente la présence de LM-Fe dans la cellule et donc la possibilité de former le radical hydroxyle HO•. Cette production de HO• est à l'origine de nombreuses oxydations de biomolécules au court de l'effort. Ces altérations ont pu être mises en évidence dans les cellules musculaires au cours d'un effort, avec notamment une stimulation de la peroxydation lipidique des acides gras insaturés membranaires. La production d'acide lactique au cours d'un effort peut donc contribuer, via la mobilisation du LM-Fe, au stress oxydatif cellulaire (Jenkins, Beard 2000).

### g. Le peroxysome et les oxydases des peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites cellulaires à membrane simple ayant un rôle essentiel pour l'homéostasie redox intracellulaire. On retrouve une cinquantaine d'activités enzymatiques différentes au sein d'un peroxysome, dont de nombreuses activités oxydantes capables de produire des ROS. Nous pouvons citer l'oxydation des acides aminés et la  $\beta$ -oxydation des acides gras, qui est la principale voie métabolique de dégradation des acides gras dans l'organisme.

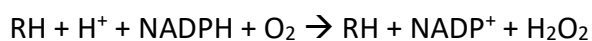
Ces oxydations engendrent la production de nombreuses molécules de peroxyde d'hydrogène, catalysée notamment par l'acyl-CoA oxydase. Ces réactions font du peroxysome le lieu principal de production de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  dans la cellule (del Río, López-Huertas 2016). On retrouve également dans le peroxysome l'enzyme xanthine oxydase qui catalyse la formation de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , et des NOS produisant du monoxyde d'azote NO, lui-même capable de réagir avec un anion superoxyde pour former l'anion peroxytrite  $NO_3^-$ .

Les peroxysomes possèdent également des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la peroxiredoxine, ce qui permet le fait que seule une faible proportion du peroxyde d'hydrogène produit peut diffuser vers la cellule (Wanders, Waterham 2006).

### h. Les cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont des enzymes hème monooxygénases, c'est-à-dire qu'elles catalysent la dégradation de l'hème. Elles sont présentes principalement dans les membranes du réticulum endoplasmique des cellules de nombreux tissus tels que le foie, les poumons, les reins, le cerveau et l'épithélium intestinal.

Elles ont un rôle crucial dans le métabolisme et les biotransformations des médicaments et xénobiotiques, en catalysant majoritairement des réactions d'oxydation. Il existe une étape au cours de leur cycle catalytique pouvant mener à la formation de peroxyde d'hydrogène, ce phénomène est nommé « découplage réactionnel » :



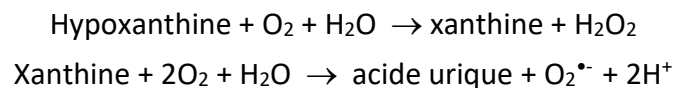
La formation de peroxydes d'hydrogène par les cytochromes P450 dépend de nombreux facteurs tels que le pH et la concentration en  $O_2$  de leur environnement, mais aussi de l'isoforme de P450 et du substrat oxydé.

Chez l'homme, un lien a été mis en évidence entre la production de ROS par les cytochromes P450 et différentes maladies telles que certains cancers, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Veith, Moorthy 2018).

### i. Les xanthines oxydoréductases

La xanthine oxydoréductase existe sous deux formes dans la cellule : la xanthine déshydrogénase – abrégée XDH dans la littérature scientifique — et la xanthine oxydase – abrégée XO dans la littérature scientifique. Ces deux formes sont interconvertibles en fonction des conditions du milieu. La XDH est majoritaire en milieu aérobie, tandis que la forme XO est favorisée par l'hypoxie cellulaire.

La xanthine oxydoréductase est la principale enzyme du catabolisme des bases puriques. Elle est localisée principalement dans les parois des vaisseaux de nombreux tissus, dont le myocarde et les muscles squelettiques, et elle est également présente dans les cellules épithéliales mammaires et dans le lait. La XDH catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis de la xanthine en acide urique en utilisant le NADP<sup>+</sup> comme accepteur d'électron, tandis que la XO catalyse ces mêmes réactions en utilisant l'O<sub>2</sub> le comme accepteur d'électron, selon les réactions suivantes (Hellsten 2000):



Les réactions d'oxydation catalysées par la XO aboutissent donc à la formation de peroxyde d'hydrogène et de l'ion superoxyde.

Ces réactions sont particulièrement importantes dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion au cours d'un effort. En effet lors de l'ischémie musculaire deux phénomènes sont à l'origine d'une augmentation de l'activité de la XO :

- Le métabolisme anaérobie de l'ATP génère de l'hypoxanthine
- La Xanthine déshydrogénase est convertie en XO lors de phases d'ischémie

Ainsi lors de la reperfusion du muscle, le taux d'oxygène augmente dans les cellules musculaires, et la xanthine oxydase peut convertir l'hypoxanthine en xanthine, puis la xanthine en acide urique et former des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (Figure 17) (Deaton, Marlin 2003).

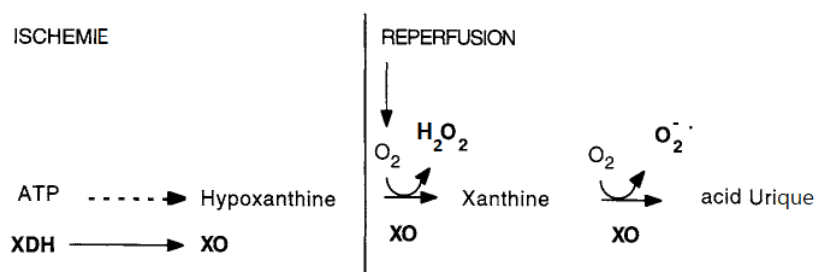


Figure 17 : Mécanismes par lesquels la XO génère des ROS lors de phénomènes d'ischémie-reperfusion (Hellsten 2000)

La xanthine oxydase contribue donc à l'augmentation du taux de ROS dans le muscle à la suite d'un effort, et certaines études ont permis de montrer qu'elle était à l'origine de lésions musculaires au cours d'exercices musculaires anaérobies (Hellsten 2000).

### 3. Effets bénéfiques des ROS

Les ROS ont longtemps été considérés comme étant des molécules uniquement toxiques pour la cellule.

En 1973 un lien entre la production de l'ion superoxyde et l'activité bactéricide des neutrophiles a été mis en évidence. Depuis, un grand nombre de recherches ont montré que les ROS avaient de nombreux rôles essentiels aux bons fonctionnements cellulaires et immunitaires. De plus comme nous le verrons par la suite, les ROS font l'objet d'une régulation stricte au sein de l'organisme. Pour cela les cellules possèdent les systèmes antioxydants permettant de contrôler le nombre de ROS et de prévenir leurs effets délétères (Thannickal, Fanburg 2000). En résumé, les ROS sont essentiels au bon fonctionnement de la cellule et possèdent des effets bénéfiques lorsque leur concentration est régulée, inversement ils peuvent devenir nocifs si leur production augmente ou que leur régulation diminue, c'est le stress oxydatif (Kudryavtseva et al. 2016).

#### i. Rôles de lutte contre les pathogènes

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les cellules de l'immunité sont capables de générer de nombreuses espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, l'ion superoxyde, le radical hydroxyle et l'acide hypochloreux, grâce à leurs enzymes NADPH oxydases, myéloperoxydases et NO synthases.

Ces ROS oxydent les différents constituants des cellules cibles et désorganisent ainsi leurs membranes et leur homéostasie. Les ROS participent donc à la destruction des éléments pathogènes tels que les micro-organismes, les parasites, ou encore des cellules du soi infectées ou tumorales.

#### ii. Rôles dans la signalisation cellulaire

Les ROS sont connus pour avoir un rôle clé dans une grande variété de systèmes physiologiques cellulaires, dont l'adaptation à l'hypoxie, la régulation de l'autophagie - qui consiste en la dégradation partielle d'éléments cellulaires, par utilisation de ses propres lysosomes, par exemple en cas de jeûn, de réaction inflammatoire, ou de dysfonctionnement d'éléments cellulaires -, de la réponse inflammatoire, de la différenciation et de la régulation de l'apoptose. L'implication des ROS dans la signalisation cellulaire passe par 2 mécanismes principaux : la modification du statut redox cellulaire, et l'oxydation des protéines. (Thannickal, Fanburg 2000).

Dans le cas de l'hypoxie cellulaire, qui nous intéresse particulièrement dans le cadre de notre étude, la cellule met en place des mécanismes adaptatifs afin d'augmenter son apport en O<sub>2</sub>. Ces mécanismes reposent sur le fait que, par un mécanisme encore inconnu, l'hypoxie entraîne une augmentation de la production de ROS par la mitochondrie, ce qui permet l'activation de l'« hypoxia-inducible factor » qui orchestre la réponse cellulaire face à l'hypoxie. Cette réponse comprend l'augmentation de production d'érythropoïétine, du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire et des enzymes glycolytiques qui assurent la production d'ATP (Sena, Chandel 2012). En résumé, la production de ROS en cas d'hypoxie permet une adaptation de l'organisme afin de limiter les effets délétères de cette hypoxie.

Nous avons également vu que le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup> intervenait dans la neurotransmission et le développement synaptique.

#### *4. Effets macromoléculaires néfastes des ROS*

##### *i. Altérations de l'ADN*

L'ADN est une molécule bicaténaire, et chaque brin est constitué d'unités possédant une base azotée, un désoxyribose et un groupement phosphate. Les 2 brins sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes, formant ainsi une double hélice. L'ADN est présente dans toutes les cellules des organismes vivants et porte le code génétique permettant la synthèse des protéines nécessaire à leur survie.

Les altérations de l'ADN causées par les ROS ont été clairement identifiées comme étant impliquées dans le vieillissement cellulaire, les maladies dégénératives et la cancérogénèse (Kudryavtseva et al. 2016).

Les réactions oxydatives entre les ROS et l'ADN se font à 3 niveaux de la double hélice d'ADN : sur les bases azotées, le désoxyribose ou la liaison phosphodiester. Le puissant radical hydroxyle peut notamment s'ajouter sur les doubles liaisons des bases azotées, par exemple sur la double liaison en 7,8 de la guanosine, ce qui forme le 8-oxo-7,8-dihydrodésoxyguanosine, aussi nommé 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. Ce produit d'oxydation de l'ADN a un fort pouvoir mutagène capable d'induire des transversions G>T, et nous verrons par la suite que cette molécule peut être dosée dans le sang et l'urine afin d'évaluer le stress oxydatif. De nombreux ROS sont capables d'oxyder l'ADN tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux et le peroxy-nitrite (Therond 2006).

Il existe des systèmes de réparation de l'ADN, tels que l'ADN glycosylase, mais il arrive que ces systèmes soient dépassés ou ne parviennent pas à réparer certains dommages causés par les ROS, ce qui peut être à l'origine d'anomalies de la multiplication cellulaire, de la synthèse protéique, de transmission du message génétique et de l'apoptose (Figure 18) (Grandjean 2001).

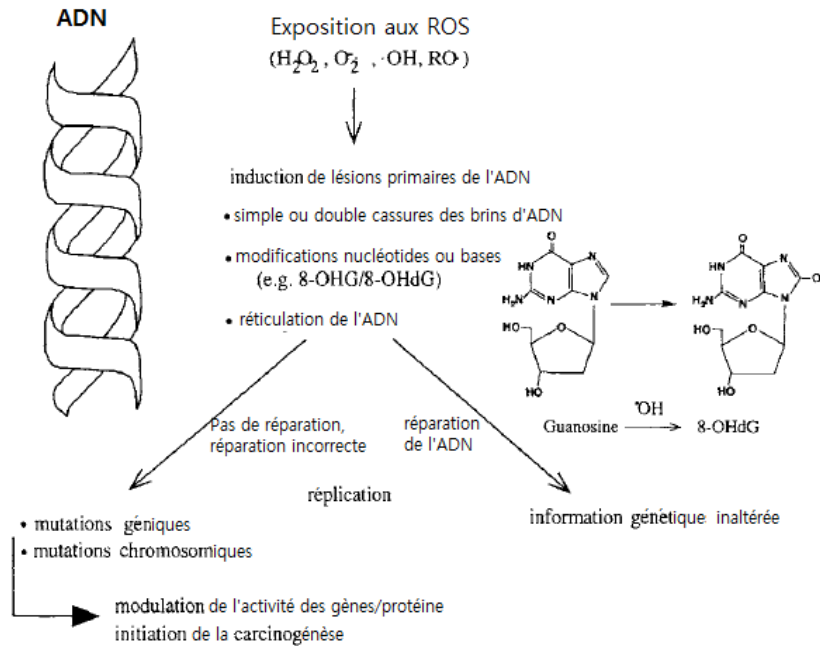


Figure 18 : Lésions de l'ADN induites par les ROS et leurs conséquences biologiques (Hartmann 2000)

Des études chez l'homme ont permis d'établir un lien entre l'exercice et les lésions de l'ADN causées par les ROS, du fait de l'augmentation de la concentration cellulaire de ces derniers au cours d'un effort de très forte intensité ou de longue durée (Hartmann 2000).

## ii. Altérations des lipides

Nous avons vu que les lipides pouvaient être oxydés par des radicaux suffisamment puissants. Les radicaux pouvant initier et propager la peroxydation lipidique sont les radicaux hydroxyles  $HO\cdot$ , hydroperoxydes  $HOO\cdot$ , peroxyde  $LOO\cdot$  et superoxyde  $O_2\cdot^-$ .

Ces réactions d'oxydation concernent les acides gras polyinsaturés, les phospholipides membranaires, le cholestérol, les triglycérides et les acides gras non estérifiés (Therond 2006). Les acides gras polyinsaturés et les phospholipides jouent un rôle majeur dans la constitution des membranes, dans la signalisation cellulaire et la communication intercellulaire, ainsi que dans la régulation de la transcription génique (Guesnet et al. 2005). Le cholestérol est également essentiel en tant que constituant membranaire, en assurant la fluidité membranaire, et est un précurseur de nombreuses biomolécules comme les hormones stéroïdiennes. Enfin, les triglycérides et acides gras non estérifiés jouent principalement un rôle dans le métabolisme énergétique et le stockage d'énergie dans l'organisme et principalement dans le tissu adipeux.

L'oxydation de ces lipides par les ROS forme un radical alkyle L• au cours de la réaction (1) illustrée sur la Figure 19, puis peroxyde LOO• par addition d'une molécule d'oxygène O<sub>2</sub> (2). Le radical peroxyde LOO• peut ensuite réagir avec un autre acide gras polyinsaturé LH et former un hydroperoxyde LOOH et un nouveau radical alkyle L• selon la réaction de propagation (3).

Des études ont montré que l'oxydation d'un acide gras polyinsaturé par un radical entraînait l'oxydation d'environ 25 molécules d'acides gras dans la phase de propagation.

Les radicaux peroxydes peuvent aussi se cycliser et former des peroxydes cycliques, ou encore se dimériser selon la réaction (4).

Certains anti-oxydants appelés « chain breaking », tels que la vitamine E, peuvent terminer la phase de propagation en piégeant les radicaux selon la réaction suivante (5)

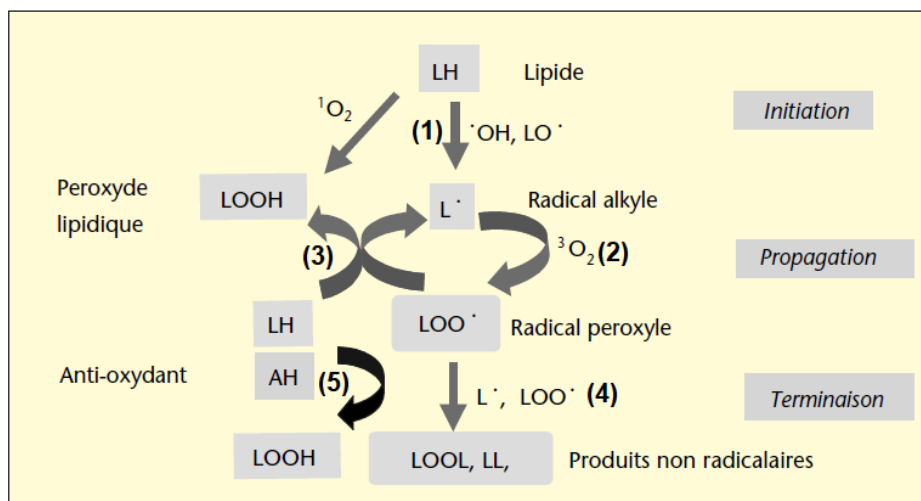
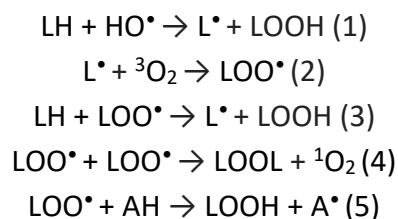


Figure 19 : mécanismes de l'oxydation des acides gras et de la propagation de la peroxydation lipidique (Cillard, Cillard 2006)

Les réactions illustrées dans la Figure 19, se déroulent selon les équations de réactions suivantes :



La peroxydation lipidique peut générer des produits secondaires tels que les aldéhydes et les isoprostanes. Nous citerons le malondialdéhyde – abrégé MDA – formé par endoperoxydation de différents acides gras polyinsaturés (Figure 20).

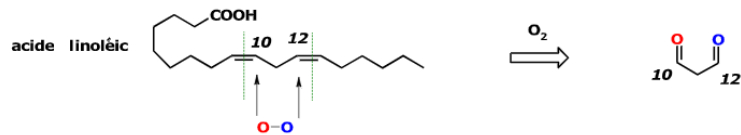


Figure 20 : Endoperoxydation de l'acide linoléique et formation d'une molécule de malondialdéhyde (MDA) (Tsikas 2017)

Le MDA a un fort pouvoir oxydant et peut réagir avec les protéines, les lipides, les carbohydrates et l'ADN. Nous verrons par la suite que les taux plasmatiques du MDA et de l'isoprostane sont également de bons marqueurs de la peroxydation lipidique (Alessio 2000).

Du fait de l'importance des lipides pour la cellule et l'organisme, leur changement de conformation va avoir des conséquences délétères sur les différents structures et voies métaboliques auxquels ils appartiennent. Il a été montré que la lipopéroxydation des membranes altérait leur structure et leur fonction par modification de leur perméabilité et de leur fluidité. Par exemple l'oxydation des cardiolipines, qui représente 18% de la membrane interne de la mitochondrie, semble être déterminant dans l'induction de l'apoptose cellulaire. On peut également citer l'implication de l'oxydation des LDL, riches en cholestérol et phospholipides, dans la formation de plaques d'athérome (Cillard, Cillard 2006).

### iii. Altérations des protéines

Les altérations des protéines par les ROS se produisent au niveau de la chaîne polypeptidique et des chaînes latérales des acides aminés. Les ROS capables d'oxyder les protéines sont principalement le radical hydroxyle  $\text{HO}^\bullet$ , le radical superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , l'acide hypochloreux  $\text{HOCl}$  et l'ion peroxydite  $\text{ONOO}^-$ .

- Lorsque ces réactions d'oxydation se produisent au niveau de la chaîne peptidique, elles provoquent l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le carbone de la liaison peptidique et forment ainsi un radical peptidique désigné par le numéro (1) sur la Figure 21, puis un groupe imine  $\text{C}=\text{N}$  (2), qui peut ensuite réagir de deux façons :
  - Si deux radicaux peptidiques sont formés proches l'un de l'autre, ils peuvent former des liaisons entre eux
  - Dans le cas contraire, le peptide est hydrolysé, formant ainsi deux peptides : l'un avec une fonction carbonyle (a) et l'autre avec une fonction amide (b).

Les protéines carbonylées (a) sont des marqueurs du stress oxydatif, et il a été montré que ces dernières s'accumulent dans les cellules avec le vieillissement. Par exemple, une étude a montré que le taux de protéines carbonylées était augmenté de 50% dans les muscles des rats âgés par rapport aux muscles des rats jeunes (Tirosh, Reznick 2000).



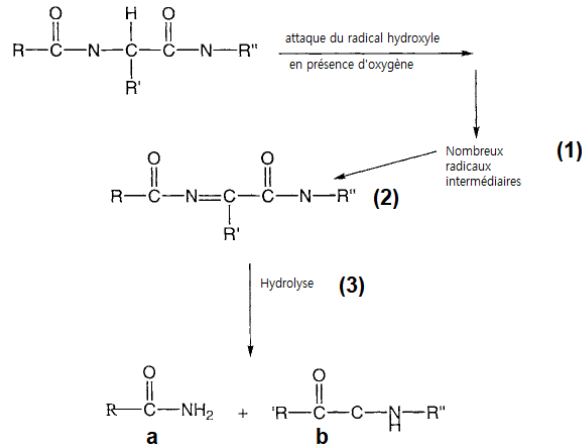


Figure 21 : Oxydation d'un peptide par un radical hydroxyle à l'origine d'une rupture de la liaison peptidique (Tirosch, Reznick 2000)

- Si l'attaque des ROS se fait plutôt sur les chaînes latérales des acides aminés, cela peut avoir plusieurs conséquences sur la structure de la protéine en fonction de l'acide aminé touché. Par exemple l'oxydation de groupements thiol de la cystéine, peut mener à la formation réversible de ponts disulfures. Un autre exemple est celui de la réaction des aldéhydes - produits de la peroxydation lipidique – avec les groupements thiol -SG et amine -NH<sub>2</sub> des acides aminés par des réactions d'addition de Michael (Figure 22) qui peuvent être réversibles et irréversibles. Ces réactions peuvent aboutir à la formation de liaisons intramoléculaires et intermoléculaires avec une autre protéine ou un lipide.

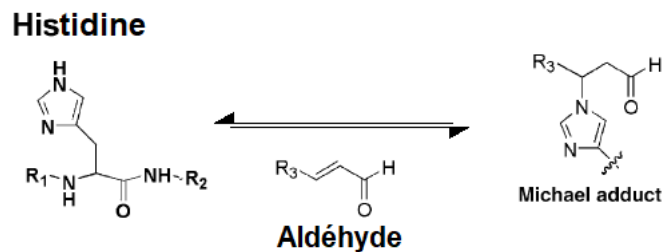


Figure 22 : Exemple d'addition de Michael sur un acide aminé : l'histidine (Marnett, Riggins, West 2003)

Les protéines ont des rôles très variés dans l'organisme : une fonction structurale avec par exemple la formation du collagène, mais aussi une fonction immunitaire notamment via les anticorps, une fonction dans le transport et la réception de molécules, une fonction enzymatique et une fonction dans l'élimination des autres protéines grâce notamment aux protéines chaperonnes. Certaines altérations provoquées par les ROS sont irréversibles et vont entraîner la perte de fonction de la protéine impliquée. Nous pouvons donner l'exemple de la modification du site actif de la tyrosine hydroxylase par l'acide peroxyntrique, qui conduit à une inhibition de la synthèse de dopamine.

Les protéines oxydées peuvent être éliminées grâce à deux systèmes principaux : les lysosomes, pour les protéines extracellulaires principalement, et les protéasomes, pour les protéines intracellulaires. Les protéasomes sont des complexes multiprotéiques chargés de dégrader les protéines dont la structure a été modifiée. Cependant ce système ne fonctionne que sur les protéines faiblement oxydées. Les protéines trop fortement oxydées pour être dégradées peuvent s'agréger par des interactions hydrophobes et s'accumuler dans la cellule en formant des dépôts de lipofuscine par agglomération avec diverses autres lipides et pigments caroténoïdes. La nature des protéines, des lipides, des pigments présents dans les dépôts de lipofuscine, ainsi que le degré d'oxydation des molécules, peuvent fortement varier. Ces dépôts peuvent inhiber le fonctionnement du protéasome, stopper la division cellulaire et induire l'apoptose. Ces dépôts peuvent également s'accumuler dans le milieu extracellulaire après une mitose ou la mort cellulaire. On retrouve ce phénomène principalement au niveau des neurones, des cardiomyocytes, des muscles squelettiques et de la rétine. Dans ces tissus les dépôts de lipofuscine sont délétères au bon fonctionnement cellulaire et réduisent la durée de vie des cellules (Therond 2006). Il a été montré que l'oxydation protéique était impliquée dans l'apparition et le développement d'affections telles que le cancer, les maladies neurodégénératives et l'athérosclérose (Tirosh, Reznick 2000).

Une étude menée sur des rats a montré que l'exercice musculaire était à l'origine d'une augmentation de l'oxydation protéique dans les cellules musculaires, qui est probablement liée à l'augmentation des ROS au cours de cet exercice (Tirosh, Reznick 2000).

#### iv. Altérations de la mitochondrie

Nous avons vu que la mitochondrie était un haut lieu de production des ROS. Elle est notamment le lieu principal de production d'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  dans la cellule. En effet ces ROS sont 5 à 10 fois plus concentrés dans la mitochondrie que dans le cytosol.

Les molécules constitutives de la mitochondrie sont donc fortement exposées aux ROS. Par exemple, l'ADN mitochondriale présente 10 à 20 fois plus de bases oxydées que l'ADN nucléaire. Les ROS peuvent également réagir avec les composants de la membrane mitochondriale et en modifier la structure, permettant un afflux de calcium dans la mitochondrie. L'augmentation de la concentration en calcium active une nucléase mitochondriale à l'origine de la dégradation de tous les nucléotides mitochondriaux (Cadenas, Davies 2000). Les molécules d'ADN et d'ARN oxydées peuvent conduire à l'activation d'enzymes pro-apoptotiques et donc induire la mort cellulaire (Kujoth 2005).

Il a notamment été montré que la dégradation de l'ADN mitochondrial était fortement impliqué dans le vieillissement cellulaire et la cancérogénèse (Kudryavtseva et al. 2016).

Nous avons vu que les ROS étaient à l'origine de lésions de l'ADN, des protéines et des lipides, et provoquent ainsi des perturbations des fonctions et des structures cellulaires. Certaines de ces lésions ne sont pas réparables par les systèmes antioxydants cellulaires, et entraînent l'accumulation de produits d'oxydation des protéines, tels que les protéines carbonylées, et de produits d'oxydation des lipides, membranaires principalement, comme les isoprostanes et les aldéhydes, dans les tissus au cours du temps.

Il a également été montré que les lésions engendrées par les ROS sont en lien avec certaines maladies dégénératives.

Ces résultats font émerger l'idée d'un lien entre le vieillissement et le stress oxydatif : c'est la théorie radicalaire du vieillissement (Figure 23).

Cette théorie, encore largement débattue, est confortée par une étude menée sur des mouches et des drosophiles qui a montré que l'augmentation de l'expression de deux enzymes antioxydantes - la catalase et la superoxyde dismutase - diminuait les lésions oxydatives liées à l'âge, et augmentait la durée de vie de ces insectes (Tirosh, Reznick 2000).

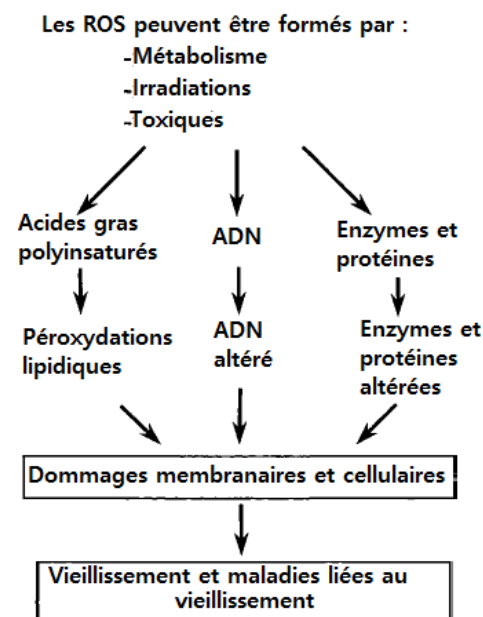


Figure 23 : Effets des ROS sur les systèmes biologiques : théorie du vieillissement radicalaire (Tirosh, Reznick 2000)

## C. Les systèmes de défense cellulaire contre le stress oxydatif

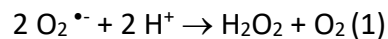
Nous avons montré qu'il y avait différentes voies de production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules des différents tissus de l'organisme. L'homéostasie rédox des cellules indique qu'il existe nécessairement des systèmes de défense cellulaire antioxydants capables de neutraliser ces ROS, permettant ainsi de retarder et de prévenir l'oxydation des macromolécules. Le principe général des réactions antioxydantes repose sur la capacité de l'antioxydant à transférer un électron à l'espèce réactive, et ainsi de la stabiliser (McMichael 2007). On distingue deux principaux systèmes de défense cellulaire contre le stress oxydatif : les systèmes enzymatiques et les systèmes non-enzymatiques (Powers, Sen 2000).

Il a été montré que le facteur de transcription Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, abrégé Nrf-2, était central dans la réponse de l'organisme au stress oxydatif causé par l'effort. Il a été montré que, chez de jeunes athlètes, la réalisation d'un exercice physique de haute intensité et de longue durée, était à l'origine d'une expression augmentée du facteur Nrf-2, et que ce dernier permettait de stimuler la production d'enzymes antioxydantes et l'activation de gènes codants pour d'autres molécules antioxydantes (Thomas, Kenfield, Jimenez 2017).

### 1. *Systèmes enzymatiques spécifiques*

#### i. *La superoxyde dismutase*

La superoxyde dismutase, abrégée SOD dans la littérature scientifique, est une enzyme à la fois intracellulaire, localisée dans la mitochondrie et le cytosol de la cellule, et extracellulaire. Elle permet de neutraliser les radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet-}$  et former du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  selon la réaction (1) (Deaton, Marlin 2003). On estime que 80% des radicaux superoxydes produits dans la mitochondrie sont neutralisés par la SOD et que les 20% restant peuvent diffuser dans le cytosol (Suzuki et al. 2000).



La SOD possède des métaux de transition dans son site actif qui lui permettent de catalyser la dismutation du radical superoxyde. On distingue ainsi trois isoformes de SOD dans les cellules des mammifères : la SOD à cuivre-zinc, notée CuZn SOD, localisée principalement dans le cytosol, le milieu extracellulaire, et l'espace intermembranaire des mitochondries, la SOD à manganèse, notée Mn SOD, localisée principalement dans la mitochondrie et la EC SOD localisée dans l'espace extracellulaire.

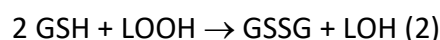
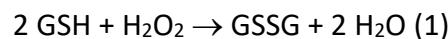
La Mn SOD est inductible, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation de la transcription du gène Mn SOD provoquée par de nombreux agents chimiques ou physiques tels que les cytokines (TNF $\alpha$ , interféron  $\gamma$ ) ou les rayonnements ionisants et UV A. Elle fait également l'objet d'une régulation post-transcriptionnel, avec notamment une augmentation de la traduction de son ARNm en cas de stress oxydatif cellulaire. Il a été montré que la Mn SOD était fortement présente dans les tissus du chien, comparativement à d'autres espèces telle que le porc et la souris, et que son activité était augmentée dans les fibres musculaires à métabolisme oxydant élevé, comme les fibres musculaires de type I et Iia, et ce après un exercice de forte intensité.

De plus, certaines études chez les rongeurs et chez l'homme ont permis de mettre en évidence que l'entraînement sportif entraînait une augmentation du nombre de SOD dans les globules rouges et les cellules des muscles squelettiques (Deaton, Marlin 2003). Le mécanisme à l'origine de l'augmentation du nombre de SOD avec l'entraînement n'est pas encore totalement élucidé, mais pourrait être lié à une modulation de la transcription de l'ADN mitochondrial par les ROS au cours de l'exercice (Suzuki et al. 2000).

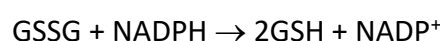
Il a été montré que la SOD avait un effet protecteur sur l'endothélium vasculaire lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion. Cet effet protecteur est assuré par la prévention de la formation de ROS délétères pour l'endothélium vasculaires, tels que l'oxyde nitrique NO $\cdot$  et l'ion peroxinitrite NO $_3^-$ , par neutralisation des ions superoxydes qui contribuent normalement à leur formation (Beckman, Freeman 1990).

## ii. La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase, abrégée GPX dans la littérature scientifique, est une enzyme localisée dans la mitochondrie, le cytosol, et la membrane plasmique. Il existe 4 isoformes de GPX, noté de GPX1 à GPX4. Elle permet la réduction du peroxyde d'hydrogène H $_2$ O $_2$  et des hydroperoxydes organiques LOOH, respectivement en eau H $_2$ O (1) et en alcool LOH (2), en utilisant le glutathion réduit - abrégé GSH - comme donneur d'électron. La GPX est donc une enzyme essentielle à la protection des biomolécules cellulaires et notamment des lipides membranaires. Le fait qu'elle soit présente à la fois dans la mitochondrie, le cytosol, et la membrane plasmique lui permet de réduire le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes produits dans les différents compartiments cellulaires.



La GPX a donc besoin de GSH pour catalyser ces réactions. La réduction du GSSG en GSH est assurée par la glutathion réductase qui utilise le NADPH comme pouvoir réducteur pour réaliser la réaction suivante :

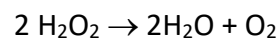


Dans la plupart des tissus, une part importante de NADPH provient de la voie métabolique des pentoses phosphates. En revanche dans le muscle squelettique, la génération de NADPH est majoritairement assurée par l'enzyme isocitrate déshydrogénase.

Il a été montré que l'activité de la GPX augmentait dans les fibres musculaires squelettiques de types I et IIa durant un exercice d'entraînement (Powers, Sen 2000).

### iii. La catalase

La catalase – abrégée CAT dans la littérature scientifique – est une enzyme présente partout dans la cellule, avec des concentrations plus élevées dans le peroxysome et la mitochondrie. La fonction primaire de la catalase est la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Pour réaliser cette réaction, la catalase nécessite de l'oxyde ferrique qui joue le rôle de cofacteur présent dans son site actif. La catalase et la glutathion peroxydase ont des fonctions similaires, mais n'ont pas la même affinité pour le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En effet, la GPX des mammifères a une plus haute affinité pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  quand celui-ci est présent en faible concentration dans la cellule, inversement la CAT a une affinité plus haute lorsque qu' $\text{H}_2\text{O}_2$  est présent en forte concentration (Powers, Sen 2000).

La catalase est essentielle au bon fonctionnement cellulaire et à l'homéostasie redox. En effet il a été montré que de nombreuses maladies telles que certains cancers, le diabète ou encore les maladies neurodégénératives étaient liées à une baisse d'activité de la catalase.

Il a également été montré que son activité et son expression sont augmentées dans les fibres musculaires squelettiques soumises à un stress oxydatif (Nandi et al. 2019).

### iv. Autres enzymes antioxydantes

Il existe d'autres enzymes antioxydantes dans la cellule telles que les thioredoxines et les peroxiredoxines.

Le système antioxydant des thioredoxines – aussi notées Trx dans la littérature scientifique – est composé de 3 protéines avec des fonctions enzymatiques différentes : les thioredoxines, les thioredoxines réductases et les thioredoxines peroxydases.

Les thioredoxines sont des oxydoréductases capables de réduire les ponts disulfures des protéines à groupements thiols oxydés grâce à un site actif contenant deux résidus cystéines pouvant réversiblement s'oxyder et former un pont disulfure selon la réaction (1) illustrée sur la Figure 24 ci-dessous. Ce pont disulfure peut ensuite être réduit par action de la thioredoxine réductase - notée TrxR - en présence de NADPH (2) (Powers, Sen 2000).

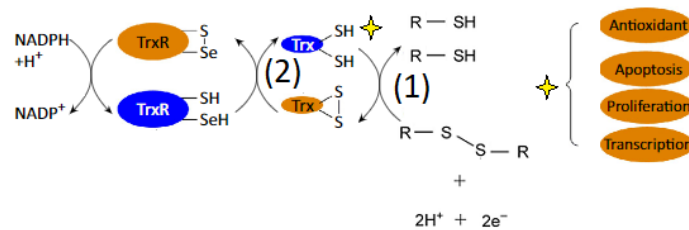
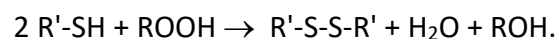


Figure 24 : Cycles catalytiques (1) et (2) et fonctions du système thioredoxine (Zhang et al. 2017)

La thioredoxine a donc un rôle capital dans la cellule en régulant le statut redox des protéines thiols, parmi lesquelles on retrouve des enzymes essentielles au bon fonctionnement du métabolisme intermédiaire, comme la glucose-6 phosphate déshydrogénase, la phosphofructokinase, la phosphoglycérate kinase, et la pyruvate kinase. Elle est aussi capable d'inactiver le peroxyde d'hydrogène et les espèces radicalaires de la cellule et permet ainsi une protection des biomolécules contre le stress oxydatif cellulaire.

Nous avons vu que TrxR permet la réduction de la Trx. Elle est aussi capable de catalyser la réduction de l'acide ascorbique – aussi nommé vitamine C – oxydé. La TrxR a donc un rôle antioxydant central en permettant l'activation des 2 systèmes antioxydants que sont la Trx et la vitamine C.

La thioredoxine peroxydase est située dans le cytosol, où elle catalyse la conversion d'hydroperoxydes et d'alkyl hydroperoxydes en eau et en alcool selon la réaction :



Elle permet également de stabiliser les radicaux thiyls formés par réactions des thiols avec les ROS, selon des réactions que nous détaillerons dans la suite de ce travail. Les radicaux thiyls sont capables de provoquer des dommages oxydatifs de nombreuses biomolécules, comme les lipides et les protéines. L'inactivation de ces derniers par la thioredoxine peroxydase permet donc de réduire le stress oxydatif cellulaire (Powers, Sen 2000).

Il a également été montré que le système Trx/TrxR a une grande importance dans la cancérogénèse par son action anti-apoptotique et sa capacité à activer certains facteurs de transcription.

Les peroxiredoxines sont présentes dans le cytosol, la mitochondrie, les peroxysomes et le plasma. Il existe 6 isoformes de peroxiredoxines. Elles sont capables de protéger les protéines et les lipides contre les dommages oxydants provoqués par les ROS, notamment dans les globules rouges au sein desquels elles sont très présentes. Elles sont également impliquées dans la régulation de l'apoptose, dans la prolifération et la différenciation cellulaire et dans l'expression des gènes (Deaton, Marlin 2003).

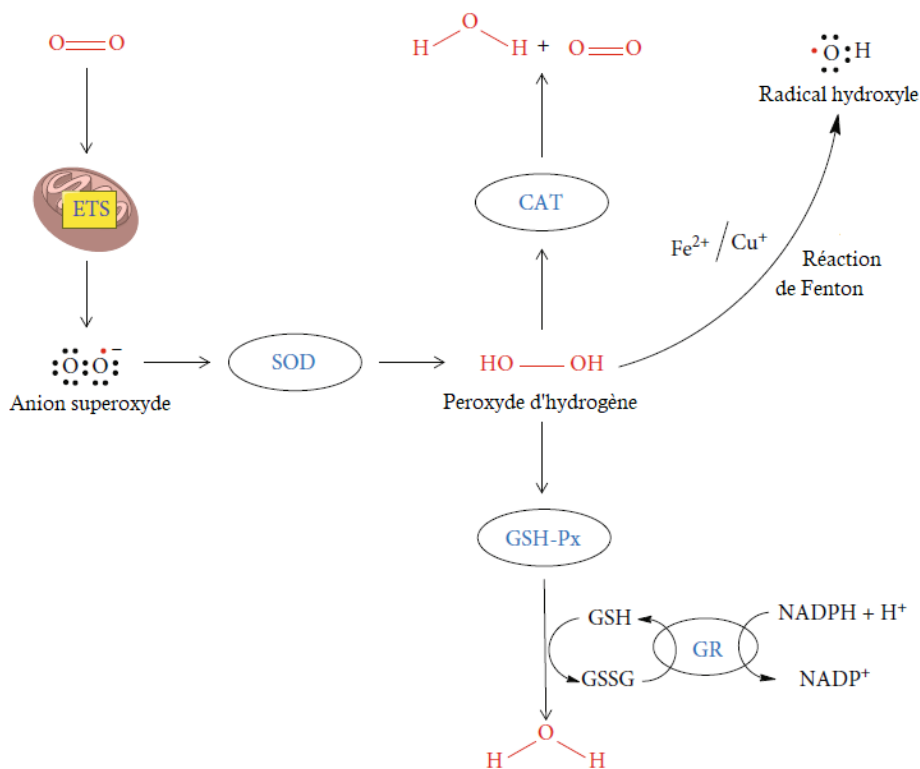


Figure 25 : Principaux mécanismes d'action de la superoxyde dismutase SOD, de la glutathione peroxydase GSH-Px, de la catalase CAT et de la glutathion réductase GR (Nandi et al. 2019)

La superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase sont des systèmes enzymatiques antioxydants clés de la cellule, capables de réagir avec le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes pour les inactiver (Figure 25). Nous avons vu que d'autres systèmes enzymatiques tels que les thioredoxines et les peroxiredoxines, permettaient également de diminuer la quantité de ROS dans la cellule et de contribuer à l'homéostasie redox en réparant les molécules à groupements thiols oxydés notamment. Ces systèmes semblent être particulièrement sollicités lors d'un effort, en effet nous avons vu que les activités des enzymes antioxydantes étaient augmentées dans le muscle squelettique au cours d'un effort, et permettaient ainsi de limiter le stress oxydatif généré par l'exercice.

La partie suivante va nous permettre d'étudier les systèmes antioxydants non enzymatiques, qui participent avec les enzymes, au maintien de l'homéostasie redox de la cellule.



## 2. *Système de défense non spécifique : les agents antioxydants*

Nous distinguerons dans cette partie les agents antioxydants exogènes et les agents antioxydants endogène. Ces agents ont des propriétés antioxydantes variées, puisque certains, tels que la SOD d'origine végétale ou l'ubiquinone principalement d'origine animale, permettent de prévenir la formation des ROS, et sont ainsi des antioxydants très efficaces. On distingue également des antioxydants dits antioxydants « stœchiométriques », tels que la vitamine E, qui réagissent mole à mole avec les ROS, en les transformant en des composés moins réactifs.

### i. Les agents antioxydants exogènes liposolubles

Les agents antioxydants liposolubles ont par définition une affinité pour les lipides. Cette caractéristique leur permet d'agir au sein des membranes des différents tissus de l'organisme, ce qui leur confère un rôle essentiel dans la limitation de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés, et donc dans la protection des membranes face au stress oxydatif.

#### a. La vitamine E

La vitamine E comprend 8 isomères : 4 tocophérols –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  – et 4 tocotriénols –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . L'isoforme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol qui représente environ 90% de l'activité de la vitamine E dans les tissus, de ce fait, elle est l'antioxydant membranaire le plus important. Elle est en effet capable de neutraliser les radicaux libres au niveau des membranes, en agissant notamment comme « chain breaking antioxydant » lors de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (Grandjean 2001). Ce mécanisme repose sur la capacité de la vitamine E à réagir avec les peroxydes lipidiques  $\text{LOO}^\bullet$  pour former des hydroperoxydes lipidiques  $\text{LOOH}$  selon la réaction suivante :



Cette réaction est 1000 fois plus rapide que la réaction des peroxydes entre eux et que celle des peroxydes avec d'autres acides gras polyinsaturés membranaires. C'est la raison pour laquelle la vitamine E permet de stopper les réactions de propagation de peroxydations lipidiques.

La forme oxydée de la vitamine E est rapidement réduite par d'autres antioxydants, ce processus est appelé « recyclage de la vitamine E ». Il repose sur les antioxydants hydrosolubles suivant : l'ubiquinone, l'ascorbate – aussi appelé vitamine C, et les thiols, dont le glutathion. La fonction antioxydante de la vitamine E dépend donc d'un apport constant en antioxydants hydrosolubles.

La vitamine E est apportée par la nourriture, puis est absorbée au niveau intestinal, pour être ensuite transportée dans le plasma sous une forme liée aux lipoprotéines. Sa distribution aux tissus est donc directement liée au métabolisme des lipoprotéines (Traber 2000).

Son rôle est fondamental pour la préservation des membranes cellulaires exposées à un fort taux de ROS. De nombreuses études menées chez l'homme et chez le chien ont permis de montrer qu'elle diminuait l'altération des membranes cellulaires lors d'un stress oxydatif engendré par un effort par exemple, et également lors du vieillissement (Grandjean 2001). Un apport adapté en vitamine E et en anti-oxydant hydrosoluble par l'alimentation apparaît donc essentiel à la protection des membranes cellulaires lors d'un stress oxydatif.

### b. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux naturels, comme le  $\beta$ -carotène et le lycopène, responsables des couleurs jaune, orange et rouge de certains fruits et légumes. Une cinquantaine de caroténoïdes, dont le  $\beta$ -carotène, ont une activité provitaminique A, via leur conversion en rétinol – forme active de la vitamine A – dans les cellules de la muqueuse intestinale. Mais des études ont montré que leurs propriétés antioxydantes n'étaient pas liées à leur activité provitaminique A. Il a également été montré qu'un taux plasmatique élevé en vitamine A favorisait l'absorption du  $\beta$ -carotène, et qu'inversement un taux plasmatique bas en vitamine A favorisait le clivage du  $\beta$ -carotène en rétinol. Ainsi le taux de vitamine A plasmatique influence le statut antioxydant en modifiant le taux d'absorption de  $\beta$ -carotène (Decker, Clarkson 2000).

Une fois ingérés, les  $\beta$ -carotènes sont des antioxydants liposolubles présents principalement dans les membranes cellulaires de l'organisme. Leurs propriétés viennent de leur structure moléculaire composée d'une longue chaîne de doubles liaisons conjuguées – c'est-à-dire séparées par une liaison simple (Figure 26). Cette structure leur permet de piéger et réduire de nombreux ROS comme l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les caroténoïdes ont donc un rôle de protecteurs des membranes cellulaires en limitant le nombre de peroxydations lipidiques induites par les ROS et jouent donc le rôle de « chain-breaking ». Ce rôle reste tout de même limité en comparaison de celui de la vitamine E ou de l'ubiquinone, puisque leurs concentrations au niveau des membranes est bien moindre (Powers, Sen 2000).

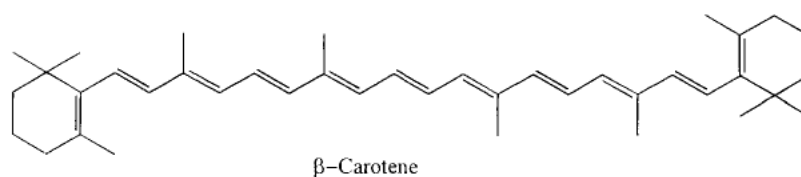


Figure 26 : exemple de caroténoïde : le  $\beta$ -carotène (Decker, Clarkson 2000)

Enfin, il est également important de noter que les capacités antioxydantes des caroténoïdes dépendent de leur concentration, ainsi que de la concentration en oxygène du milieu. En effet à haute concentration d'oxygène, certains caroténoïdes peuvent réagir avec l'O<sub>2</sub> pour produire des ROS tels que les peroxydes. Les caroténoïdes ont donc une fonction antioxydante en milieu à faible concentration d'oxygène seulement (Phan-Thi 2014).

### c. L'ubiquinone

Nous avons vu que l'ubiquinone, aussi appelée coenzyme Q<sub>10</sub>, était un transporteur d'électrons entre les complexes II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est apporté par l'alimentation, mais aussi synthétisé dans les cellules de tous les tissus de l'organisme. En condition physiologique, un apport alimentaire n'est pas nécessaire à l'approvisionnement cellulaire en ubiquinone. Cependant lors du vieillissement par exemple, la synthèse endogène ne suffit plus et un apport alimentaire par la viande, le poisson, les graines et oléagineux se révèle essentiel.

Le coenzyme Q<sub>10</sub> est absorbé dans l'intestin puis est transporté par les lipoprotéines de faible densité – abrégées LDL pour « Low density lipoprotein » - dans le plasma. Dans l'organisme on retrouve le coenzyme Q<sub>10</sub> inséré dans la bicouche lipidique des membranes plasmique, ainsi que dans toutes les membranes intracellulaires (Sen, Goldfarb 2000).

Ses propriétés antioxydantes sont multiples :

- Il limite la peroxydation lipidique en jouant le rôle de « chain breaking antioxydant »
- Il diminue l'initiation de l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN
- Il est capable de régénérer la vitamine E oxydée

Le coenzyme Q<sub>10</sub> est un très bon antioxydant du fait des propriétés citées précédemment, de sa localisation membranaire, de son abondance dans tous les tissus et des nombreux systèmes cellulaires capables de le régénérer. Il est ainsi efficace pour protéger les lipides, mais aussi les protéines et l'ADN de l'oxydation par les ROS.

Il a été montré que le nombre de coenzymes Q<sub>10</sub> présents dans les cellules variait d'un tissu à un autre. En effet, étant fortement concentré dans la mitochondrie, plus le tissu est riche en mitochondries, plus il y a de coenzymes Q<sub>10</sub> présents. Par exemple on retrouve chez les organismes adaptés au froid et ceux réalisant régulièrement un exercice intense, un taux de coenzyme Q<sub>10</sub> augmenté dans le foie et les muscle, en lien avec l'augmentation du nombre de mitochondries dans ces tissus, et donc du métabolisme aérobie et de la production de ROS (Bentinger, Tekle, Dallner 2010).

## ii. Les agents antioxydants exogènes hydrosolubles

### a. La vitamine C

La vitamine C, aussi appelée acide ascorbique, est l'antioxydant hydrosoluble le plus abondant dans l'organisme et on retrouve ce dernier dans les cellules de tous les tissus. Elle est apportée par la nourriture, notamment dans certains fruits, légumes et abats, mais peut aussi être synthétisée dans le foie chez le chien, chez qui elle est donc à la fois exogène et endogène (Grandjean 2001). La vitamine C est sous sa forme ionisée, l'ascorbate, à pH physiologique. L'ascorbate possède deux rôles antioxydants (Decker, Clarkson 2000) :

- Il est capable de détruire directement de nombreux ROS comme l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et les radicaux hydroxyles  $\text{HO}^\bullet$  et peroxydes  $\text{LOO}^\bullet$
- Il peut aussi régénérer la vitamine E dans la cellule

Lors de la réaction de la vitamine C avec les ROS ou avec la vitamine E, la vitamine C devient un radical très stable et peu réactif, l'ascorbyl, qui peut ensuite être réduit par la NADH semiascorbyle réductase, par la TrxR, mais aussi par des thiols tels que le glutathion.

Ainsi, une augmentation du taux de vitamine C intracellulaire permet de limiter le nombre de ROS et donc les altérations des biomolécules. À de très hautes concentrations cellulaires d'environ 1 mM, il a été montré que la vitamine C pouvait devenir pro-oxydante par sa capacité à réduire l'oxyde ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ , lequel catalyse la réaction de Fenton qui génère le radical hydroxyle. Nous discuterons donc par la suite de l'intérêt d'une supplémentation en vitamine C, et de sa gestion pour ne pas atteindre de trop hautes concentrations cellulaires.

### b. Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés chimiques formés par plusieurs benzènes hydroxylés. Leur apport est alimentaire, ils sont présents dans de nombreuses graines et végétaux, comme le sésame et les fruits rouges.

Il a été montré que les polyphénols naturels étaient de puissants antioxydants, et cette capacité découle de plusieurs propriétés :

- Inhibition de l'activité catalytique de certaines enzymes oxydantes comme la lipoxygénase, la NOS, la XO et la myéloperoxydase
- Inactivation de nombreux ROS, ils permettent de limiter la propagation des réactions radicalaires. Ce faisant, ils deviennent eux-mêmes des radicaux phénoxyles, relativement stables et peu réactifs, possédant un électron non apparié sur leur structure cyclique
- Chélation des métaux de transition (notamment du  $\text{Fe}^{2+}$ )
- Action anti-inflammatoire

Les polyphénols peuvent réagir avec les lipides et protéines membranaires, et prévenir l'accès des ROS aux structures membranaires. En plus de la protection des membranes cellulaires face au stress oxydatif, il a été montré que les polyphénols assuraient également une protection de l'ADN (Hussain et al. 2016).

Nous étudierons par la suite que l'apport alimentaire de polyphénols permet de limiter les conséquences délétères cellulaires du stress oxydatif notamment lors d'un effort musculaire. Nous verrons également que leur absorption intestinale est très variable, d'une race à l'autre, d'un individu à l'autre, et qu'ils sont ensuite fortement métabolisés.

### c. Les phytates

Les phytates sont des composés hautement phosphorylés apportés par l'alimentation et présents principalement dans les graines et les légumineuses. Leurs propriétés antioxydantes découlent de leur capacité à chélater fortement le fer, qui nous l'avons vu est très faiblement présent sous forme libre en conditions physiologiques, mais dont la concentration peut augmenter à la faveur d'évènements pathologiques tels qu'une hémolyse ou une acidose. Dans de telles conditions, les phytates permettent donc de réduire l'activité catalytique du fer notamment dans la réaction de Fenton, et permet ainsi de diminuer la production du radical peroxy. Il faut tout de même veiller à ne pas apporter trop de phytates dans l'alimentation, puisque ceux-ci peuvent devenir toxiques à hautes doses, en diminuant très fortement la biodisponibilité de certains minéraux comme le fer, le zinc et le calcium (Decker, Clarkson 2000).

### iii. Les oligo-éléments

En tant que cofacteurs enzymatiques des systèmes enzymatiques antioxydants, les oligo-éléments sont essentiels à la défense antioxydante cellulaire. Nous avons vu que le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le manganèse (Mn) étaient des cofacteurs enzymatiques des enzymes antioxydantes superoxydes dismutases Cu/ZnSOD et MnSOD.

Le Cu joue également un rôle antioxydant lorsqu'il est fixé à la céruloplasmine, en favorisant l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$ , ce qui favorise la fixation du fer sur les protéines de transport et de stockage, telles que la transferrine et la ferritine.

Au-delà de son rôle de cofacteur enzymatique de la SOD, le Zinc permet de stabiliser les structures membranaires, de protéger les groupements sulfhydryl des protéines, et d'augmenter l'expression de la métallothionéine qui est une protéine capable de chélater des métaux lourds tels que le plomb et le mercure, et qui possède également une activité antioxydante. Le zinc permet enfin de limiter la réponse inflammatoire, et ainsi de diminuer l'effet pro-oxydant de cette dernière. Son apport doit être finement régulé, puisqu'il a été montré qu'un déficit ainsi qu'un excès de zinc dans l'organisme, était à l'origine d'un stress oxydatif cellulaire (Lee 2018).

L'oxyde ferrique  $Fe^{3+}$  est quant à lui essentiel à l'activité enzymatique antioxydante de la catalase. Même s'il paraît tout de même important de nuancer le caractère antioxydant du fer, puisque celui-ci joue un rôle majeur dans la production du puissant radical hydroxyle, en catalysant la réaction de Fenton.

Le sélénium est un oligoélément apporté par l'alimentation, qui est présent en quantité importante dans la viande, le poisson, les produits laitiers et les céréales. Dans l'organisme il est lié à des protéines appelées sélénoprotéines, divisées en 2 groupes : les sélénocystéines et les sélénométhionines. L'importance biologique du sélénium réside dans la constitution des sélénocystéines antioxydantes que sont la GPX et la Trx réductase, dans lesquelles il joue le rôle de cofacteur essentiel à l'activité antioxydante. Les sélénométhionines servent quant à elle de réservoir de sélénium et permettent d'en délivrer dans l'organisme lorsque son apport alimentaire est interrompu. Une étude menée chez des rats a montré qu'une déficience en sélénium était à l'origine d'une augmentation de la peroxydation lipidique dans les muscles squelettiques après 1 heure d'exercice (Sen, Goldfarb 2000). Nous discuterons dans la suite de ce travail de l'intérêt d'une supplémentation en sélénium chez le chien de traîneau.

#### iv. Les agents antioxydants endogènes

##### a. Le système glutathion

Le glutathion réduit – GSH pour rappel – est le principal thiol non protéique à action antioxydante. Il est présent dans toutes les cellules de l'organisme et est principalement retrouvé dans la mitochondrie et le cytosol des fibres musculaires à fort métabolisme oxydatif.

Le GSH a de très nombreuses fonctions dans la cellule et permet notamment de la protéger des dommages oxydatifs induits par certains ROS. Ce rôle antioxydant est assuré :

- Directement par le GSH qui réduit les autres thiols cellulaires et la vitamine C, et qui est lui-même oxydé en GSSG. Cependant la réduction des espèces radicalaires donne naissance à des radicaux thiyles, qui nous l'avons sont capables d'oxyder de nombreuses biomolécules. Le pouvoir antioxydant direct du GSH est donc limité
- Via la GSH peroxydase – GPX – qui réduit le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes hautement réactifs, et qui permet un recyclage de la vitamine E. L'intervention du GSH dans les réactions enzymatiques antioxydantes est donc le principal rôle antioxydant du GSH

La régulation du statut rédox des groupements thiols par le GSH est un mécanisme essentiel pour la cellule du fait que les thiols interviennent dans le cycle catalytique de nombreuses enzymes et que leur oxydation peut mener à l'inactivation réversible ou irréversibles de ces enzymes. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ce système met également en jeu l'enzyme GSH réductase qui permet de régénérer le GSH à partir du GSSG.

Il a été montré que le ratio entre le nombre de glutathions réduits et le nombre de glutathions oxydés - noté GSH/GSSG - change lors d'un stress oxydatif, et notamment lors d'un exercice physique. Un exercice modéré à intense est corrélé à une diminution de ce rapport, ce qui correspond à une oxydation du GSH, liée à l'augmentation de la production de ROS dans la cellule. Cela fait du rapport GSH/GSSG un marqueur du stress oxydatif lors d'un exercice (Sacheck, Blumberg 2001). Une étude menée sur des rats a montré que l'activité antioxydante du GSH lors d'un exercice venait aussi de sa capacité à limiter l'activation des neutrophiles et donc à limiter leur production de ROS lors de « l'explosion respiratoire » (Sen, Goldfarb 2000).

Le GSH est synthétisé par l'organisme et son apport alimentaire ne permet pas son transfert jusqu'aux cellules, car celui-ci est dégradé avant de les atteindre. En revanche nous discuterons par la suite d'un apport alimentaire en N-acetyl-L-cysteine et en  $\alpha$ -lipoate, qui permet d'augmenter la synthèse de GSH dans les cellules (Sen, Goldfarb 2000).

#### b. L'acide $\alpha$ -lipoïque

L'acide  $\alpha$ -lipoïque – communément abrégé LA – est un dérivé organosulfuré pouvant être biosynthétisé mais également apporté par l'alimentation. Il sert de cofacteur à plusieurs enzymes, dont 2 appartiennent au cycle de Krebs. Il est normalement présent en très faible quantité dans les cellules (5-25 nmol/g) et majoritairement fixé aux enzymes et donc non disponible comme antioxydant. C'est la fraction de LA non liée qui possède des propriétés antioxydantes dans la cellule. La forme antioxydante du LA est l'acide dihydrolipoïque – abrégé DHLA dans la littérature scientifique – qui est un puissant antioxydant capable de neutraliser de nombreux ROS, également capable de recycler la vitamine E et d'augmenter le taux de cystéine dans la cellule. Lors de ces réactions le DHLA est converti en LA, qui est ensuite de nouveau réduit en DHLA par des mécanismes enzymatiques.

Le LA peut être absorbé dans l'alimentation et est ensuite réduit en DHLA dans l'organisme. Nous avons vu qu'une supplémentation en acide  $\alpha$ -lipoïque permettait une augmentation de la synthèse du GSH notamment dans le foie et les muscles. Son apport a ainsi montré une action antioxydante lors d'exercices chez des rats, pour lesquels la peroxydation lipidique était diminuée par rapport aux rats non supplémentés (Powers, Sen 2000).

### c. L'acide urique

L'acide urique est un sous-produit du métabolisme des bases puriques dans le foie. L'acide urique est un bon antioxydant intra et extra cellulaire (Powers, Sen 2000). Il confère notamment 60% de sa capacité antioxydante au plasma. Il permet de débarrasser la cellule de ROS tels que les radicaux hydroxyles, peroxydes et nitryles, réaction au cours de laquelle l'acide urique est converti en allantoiné. Son pouvoir antioxydant vient aussi de sa capacité à chélater les métaux de transitions comme le Fer et le Cuivre (Mikami, Sorimachi 2017).

### d. La bilirubine

La bilirubine est un produit issu du catabolisme des hémoprotéines comme l'hémoglobine et la myoglobine. Elle est présente à la fois dans les milieux intra et extra-cellulaire, et notamment dans le plasma dans lequel elle est majoritairement liée à l'albumine du fait de sa solubilité partielle (Powers, Sen 2000).

La bilirubine est un antioxydant capable de neutraliser de nombreux ROS dont le radical hydroxyle, et d'inhiber la NADPH oxydase. La bilirubine oxydée est la biliverdine et le couple biliverdine-bilirubine pourrait être équivalent pour la neutralisation des ROS liposolubles, au couple GSH / GSSG pour la neutralisation des ROS hydrosolubles. Certaines études ont mis en évidence que la bilirubine pouvait diminuer la peroxydation lipidique (DiNicolantonio, McCarty, O'Keefe 2018).

### d. La taurine

La taurine est un acide aminé non protéinogène, synthétisé principalement dans le foie. Elle peut aussi être apportée par l'alimentation, notamment dans les poissons, mais aussi dans la viande. Dans l'organisme on la retrouve dans tous les tissus, mais en plus forte concentration dans le foie, la rétine, les neutrophiles, le myocarde, dans toutes les cellules du système nerveux central, et dans les muscles squelettiques et plus spécifiquement dans les fibres lentes de type I. Chez l'homme, 70% du pool de taurine se trouve dans les muscles squelettiques où elle permet notamment une augmentation de la contractilité musculaire.

Ses rôles antioxydants sont multiples (Figure 27) :

- Activité importante de neutralisation des ROS suivants : les radicaux peroxydes  $ROO^{\bullet}$ , le monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ , l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , et le peroxyde nitrite  $ONOO^-$
- Diminution de la peroxydation lipidique
- Augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes : de la SOD, en diminuant le stress oxydatif au niveau du réticulum endoplasmique et en favorisant ainsi l'expression de la EC SOD. La taurine augmenterait également l'activité de la CAT et de la GPX.



- Diminution de la production d'anion superoxyde dans la mitochondrie par amélioration du fonctionnement du complexe I de la chaîne mitochondriale
- Régulation et diminution de l'inflammation
- Réaction avec le HOCL produit par les neutrophiles pour former la taurine chloramine

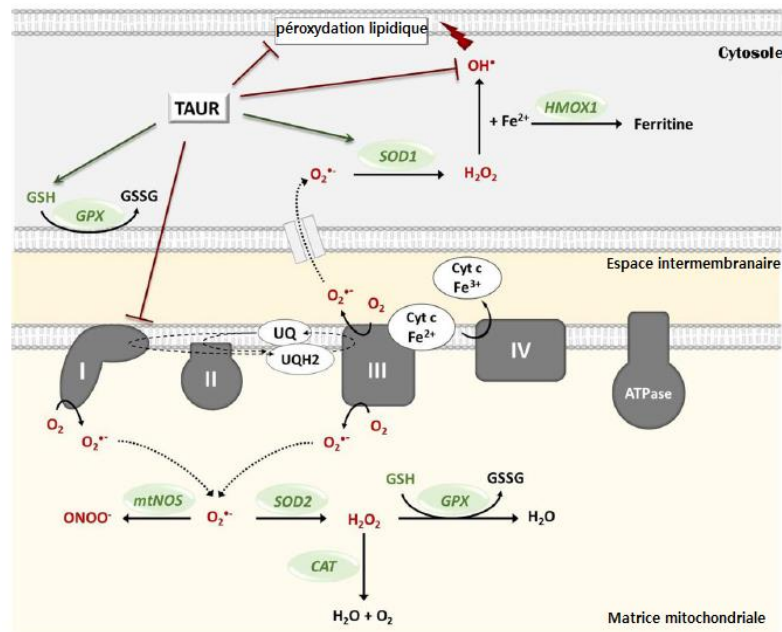


Figure 27 : Activités antioxydantes de la taurine intracellulaire (Seidel, Huebbe, Rimbach 2019)

Il a été montré que l'activité de la taurine dépendait de sa concentration : plus elle est concentrée dans le milieu et plus elle aura une activité antioxydante élevée.

Il a également été montré que la taurine avait un rôle essentiel dans le fonctionnement et la régénération musculaire lors d'un exercice. Ce rôle découle de très nombreuses fonctions que nous ne citerons pas ici, mais dont les propriétés antioxydantes étudiées précédemment font parties. En effet, de par sa forte concentration musculaire et ses propriétés antioxydantes, la taurine est un très bon antioxydant qui permet de protéger les structures cellulaires en cas de stress oxydatif lors d'un exercice par exemple (Seidel, Huebbe, Rimbach 2019).

#### e. Les protéines chaperonnes HSP70

Les protéines chaperonnes – abrégées HSP pour « Heat Shock Protein » qui signifie protéines de choc thermique – sont des protéines présentes dans le cytoplasme et le noyau de la majorité des cellules de l'organisme, dans lesquels elles assurent le repliement et l'assemblage correct des protéines. Il existe différentes HSP classées en fonction de leur poids moléculaire, et dont les plus abondantes dans l'organisme sont les HSP60, les HSP70 et les HSP90.

Les HSP70 - HSP des 70 kDa - sont d'avantage exprimées dans des conditions de stress variées. Par exemple il a été montré que lors d'une augmentation de la température corporelle ou lors d'un phénomène d'ischémie-reperfusion au niveau du myocarde, l'expression cellulaire des HSP70 augmentait significativement dans les cardiomyocytes. Il a également été montré chez l'homme qu'un effort musculaire aérobie était à l'origine d'une augmentation significative du nombre de HSP70 dans le muscle (Morton et al. 2006).

Les HSP70 possèdent une activité antioxydante du fait de leur activité chaperonne qui permet de protéger le pool de Mn-SOD mitochondrial, qui est une enzyme clé des systèmes antioxydants. Il a été montré qu'elles permettaient ainsi de diminuer le nombre de ROS cellulaires lors d'un stress oxydatif. Les HSP70 ont également un rôle anti-apoptotique. Ces mécanismes font des protéines chaperonnes HSP70 de bons protecteurs cellulaires en cas de stress oxydatif lors d'un exercice (Song, Zhong, Wang 2019).

Nous verrons dans la suite de notre travail que certaines molécules apportées par voie orale, telle que la geranylgeranylacétone, permettent d'augmenter l'expression des HSP70.

#### f. Les chélateurs du fer

Nous avons vu que le fer était un agent pro-oxydant lorsqu'il est dans sa forme libre LM-Fe, impliquée dans la genèse des ROS, dont le puissant radical hydroxyle HO<sup>\*</sup>. Mais le métabolisme du fer est finement régulé dans l'organisme, et seule une infime partie de celui-ci est retrouvée sous forme libre dans des conditions physiologiques. En effet on le retrouve lié à différentes molécules dans l'organisme : on parle de forme héminique et non héminique.

La forme héminique représente la majorité du pool ferrique de l'organisme, et celui-ci est présent dans les ferroprotéines telles que la myoglobine, l'hémoglobine et la catalase.

La forme non héminique du fer concerne le fer qui est présent dans les protéines de transport telle que la transferrine et dans les protéines de stockage telle que la ferritine. La transferrine est en excès par rapport au fer en condition physiologique et le taux de ferritine cellulaire est régulée en fonction de la quantité de fer apportée à la cellule. Cette adaptation de la quantité de protéines chélatrices par rapport à la quantité de fer permet de chélater le fer dans les milieux intra et extra cellulaires et ainsi de limiter la forme LM-Fe à fort potentiel oxydant.

Or nous avons vu que lors d'un exercice, la production de ROS et la diminution du pH cellulaire induisait une augmentation de la fraction de LM-Fe, ce qui est un processus auto-aggravant du stress oxydatif. Il a aussi été montré que les lésions des érythrocytes et de la myoglobine lors d'un exercice intense participent également à l'augmentation du fer libre (Jenkins, Beard 2000).

Les systèmes antioxydants sont donc très nombreux et entrent en synergie pour la neutralisation des ROS et des molécules oxydées, et sont donc essentiels au maintien de l'homéostasie cellulaire rédox. Nous avons également vu que ces systèmes sont capables de s'adapter lors d'une augmentation du taux de ROS cellulaires lors d'un effort par exemple, et protègent ainsi les systèmes biologiques de l'oxydation (Grandjean 2001). Les propriétés des différents systèmes antioxydants sont résumées dans le Tableau IV. Nous verrons par la suite quelles situations peuvent induire un déséquilibre de la balance ROS / antioxydants, et quels sont les affections qui en résultent.

Tableau IV : Propriétés des principaux antioxydants dans l'organisme (Peytoureau F., 2020)

Antioxydants	Localisation	Origine	Propriétés antioxydantes	Régulation et activité lors d'un exercice
<b>Enzymatiques</b>				
<b>SOD</b>	Ubiquitaire • CuZnSOD extracellulaire et cytosol • MnSOD mitochondriale	Endogène	Neutralisation de l'anion $O_2^{\bullet-}$ : $O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	• Activité augmentée fibres musculaires I+IIa • Effet protecteur lors d'ischémie/reperfusion
<b>GPX</b>	Ubiquitaire • Mitochondrie • Cytosol • Membrane plasmique	Endogène	Réduction hydroperoxydes et $H_2O_2$ → Protection des membranes	Activité augmentée fibres musculaires I+IIa
<b>CAT</b>	Ubiquitaire • Grand nombre dans les mitochondries et peroxysomes	Endogène	Décomposition du $H_2O_2$ : $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Activité et expression augmentées fibres musculaires à fort métabolisme oxydatif
<b>Exogènes liposolubles</b>				
<b>Vitamine E</b>	Ubiquitaire • Membranaire • Plasmatique, liée aux lipoprotéines	Huiles, céréales et fruits à coques	« chain breaking antioxydant » → Protecteur des membranes	Diminution par consommation → Nécessité d'un apport
<b>Caroténoïdes</b>	Ubiquitaires • Membranaires • Plasmatiques, liés aux lipoprotéines	Fruits et légumes colorés	Inactivation $^1O_2$ , $O_2^{\bullet-}$ et $ROO^{\bullet}$ → Protecteur des membranes	

<b>Ubiquinone</b>	Ubiquitaire <ul style="list-style-type: none"> <li>• Membranaire</li> <li>• Plasmatique, lié aux lipoprotéines</li> <li>• Forte concentration membrane mitochondriale</li> </ul>	Endogène et alimentaire (viande, poisson, oléagineux)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• « chain breaking antioxydant »,</li> <li>• Recycle VitE → Protecteur des membranes</li> <li>→ Protecteur ADN et protéine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entraînement sportif → Augmentation en nombre dans les muscles squelettiques,</li> <li>• Exercice intense : diminution du taux plasmatique</li> </ul>
<b>Exogènes hydrosolubles</b>				
<b>Vitamine C</b>	Ubiquitaire	Endogène (hépatique) et exogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recycle VitE</li> <li>• Inactivation <math>^1O_2</math>, <math>O_2^{\cdot-}</math>, <math>HO^{\cdot}</math> et <math>LOO^{\cdot}</math></li> </ul>	Diminution par consommation
<b>Polyphénols</b>	Ubiquitaires	Graines et végétaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inactivent NOS, XO</li> <li>• Anti-inflammatoires</li> <li>• Inactivent ROS</li> <li>• Chélateurs métaux</li> </ul>	
<b>Phytates</b>	Ubiquitaires	Graines et légumineuses	Chélateurs Fer	
<b>Oligoéléments :</b> <b>Fer</b> <b>Sélénium</b> <b>Cuivre</b> <b>Manganèse</b>	Ubiquitaires	Alimentation (viande, poisson, produits laitiers)	Cofacteurs enzymatiques SOD, XO, CAT, GPX, Trx réductases	Sélénium diminue le taux de peroxydation lipidique
<b>Endogènes</b>				
<b>Glutathion</b>	Ubiquitaire <ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte concentration fibres musculaire I+IIa</li> <li>• Forte concentration hépatique</li> </ul>	Synthèse dans le cytosol de toutes les cellules	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduit les autres thiols + Vit C + Vit E</li> <li>• Permet activité GPX</li> </ul>	Diminution du rapport GSH/GSSG
<b>Acide <math>\alpha</math>-lipoïque</b>	Ubiquitaire	Endogène et exogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutraliser de nombreux ROS</li> <li>• Recycle Vit E</li> <li>• Permet la synthèse du Glutathion</li> </ul>	

<b>Acide urique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intracellulaire (ubiquitaire)</li> <li>• Extracellulaire (plasmatique)</li> </ul>	Hépatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chélate Fer et cuivre</li> <li>• Neutralise des ROS (ex : HO<sup>•</sup>)</li> </ul>	
<b>Bilirubine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intracellulaire (ubiquitaire)</li> <li>• Extracellulaire (plasmatique)</li> </ul>	Hépatique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutralise des ROS (ex : HO<sup>•</sup>)</li> <li>• Inhibe NADPH oxydases</li> </ul>	
<b>Taurine</b>	Principalement foie, rétine, système nerveux central, muscles squelettiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endogène (principalement hépatique)</li> <li>• Exogène (poisson, viande)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutralise NO<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, HOCl et ONOO<sup>-</sup></li> <li>• Augmente activité SOD, GPX, CAT</li> <li>• Anti-inflammatoire</li> </ul>	Propriétés antioxydantes essentielles aux muscles squelettiques lors d'un exercice
<b>HSP 70</b>	Ubiquitaire (noyau et cytoplasme)	Toutes les cellules soumises à un stress	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmente activité MnSOD</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentation de leur expression</li> <li>• Activité anti-apoptotique</li> </ul>
<b>Chélateurs du fer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ferroprotéines (ex : hémoglobines)</li> <li>• Protéines stockage (ex : ferritine) et transport (ex : transferrine)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chélation du Fer → Diminution de la production de HO<sup>•</sup></li> </ul>	Hémolyse et augmentation du taux de LM-Fe sérique

### 3. Causes de diminution des défenses antioxydantes cellulaires

Il a été montré sur différentes espèces de rongeurs que les cellules d'individus âgés étaient moins capables de lutter contre les ROS dans des situations pouvant générer un stress oxydatif, comme le phénomène d'ischémie-reperfusion par exemple, par rapport aux cellules des jeunes rongeurs. Cependant il n'a pas été clairement mis en évidence que cela était dû à une baisse des capacités antioxydantes, mais plutôt à une augmentation de la génération des ROS par la mitochondrie dans les cellules des vieux individus (Beckman, Ames 2000).

Il a été supposé qu'il existe un phénomène d'hormésis chez l'animal vis-à-vis du stress oxydatif. Cela signifie que la production de ROS à petites doses pourrait induire une stimulation et une augmentation des défenses antioxydantes. En revanche il a été montré sur des cellules endothéliales qu'un stress oxydatif chronique menait à l'épuisement des systèmes antioxydants, et par conséquent à la sénescence cellulaire, phénomène schématisé sur la Figure 28 (Thorin-Trescases et al. 2010). Il existe donc un phénomène d'auto-amplification du stress oxydatif avec l'âge.

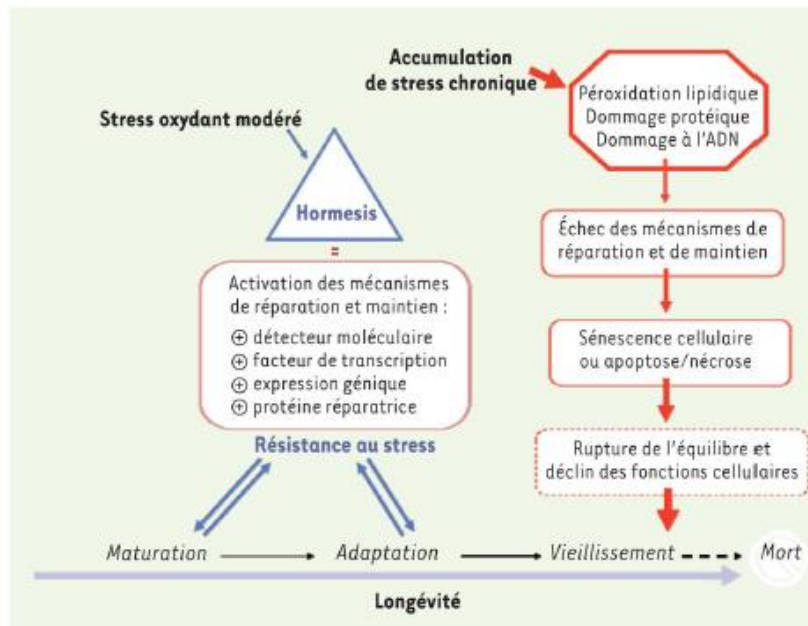


Figure 28 : Schématisation du principe d'hormésis dans la longévité endothéliale (Thorin-Trecases et al. 2010)

Nous avons également vu que le stress oxydatif généré par un exercice était à l'origine de la diminution d'antioxydants exogènes comme la vitamine E et la vitamine C, par consommation de ceux-ci dans la lutte contre les ROS produits.

Enfin nous avons vu que de nombreux antioxydants étaient apportés à l'organisme par l'alimentation, ce qui implique qu'une baisse du taux d'antioxydants dans l'alimentation peut entraîner une diminution des défenses antioxydantes cellulaires.

#### 4. Régulation des systèmes anti-oxydant liée à l'exercice

Nous avons vu que lors d'un exercice, les systèmes enzymatiques antioxydants dont la SOD, la GPX et la CAT, et les HSP70, avaient une expression et une activité augmentée, en réponse au stress oxydatif. Il a été montré que l'augmentation de leur nombre dans les cellules repose sur une régulation positive de l'expression de leurs gènes lors de l'augmentation du taux de ROS cellulaires (Powers, Sen 2000).

Cette augmentation des systèmes de défenses antioxydants a également été montrée à longs termes chez l'homme, puisque des athlètes réalisant un exercice régulier ont des capacités antioxydantes supérieures à celles des hommes non sportifs (Shern-Brewer et al. 2000).

La partie suivante va nous permettre de détailler les conséquences d'un déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydante à l'échelle de l'organisme, et ce plus particulièrement chez le chien de traîneau.

## D. Conséquences délétères du stress oxydatif induit par l'exercice à l'échelle de l'organisme

Nous avons vu qu'il existait des systèmes de neutralisation des ROS dans les cellules, ainsi que des systèmes de réparation des molécules oxydées. Cependant lors d'un stress oxydatif, le déséquilibre entre la production de ROS et les capacités antioxydantes de l'organisme mène à des lésions des biomolécules et à une accumulation des produits d'oxydation comme les lipofuscines par exemple. Nous allons étudier dans cette partie quelles sont les conséquences de ces altérations et accumulations à l'échelle tissulaire et à l'échelle de l'organisme, et ce plus particulièrement en lien avec l'exercice.

### 1. A courts termes

#### i. Les conséquences du stress oxydatif sur les fibres musculaires

Durant l'exercice, il a été montré chez l'homme et chez le rat qu'il y avait une augmentation de la production de ROS dans les fibres musculaires.

Il a été montré que la production de ces ROS était liée à l'augmentation de l'apport d'O<sub>2</sub> à la cellule. Ces ROS sont produits à la fois par la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi par les NADPH oxydases, les xanthines oxydases, les lipo-oxygénases et enfin par les cellules inflammatoires dans le tissu musculaire au cours de l'effort si celui-ci est de longue durée (Kozakowska et al. 2015).

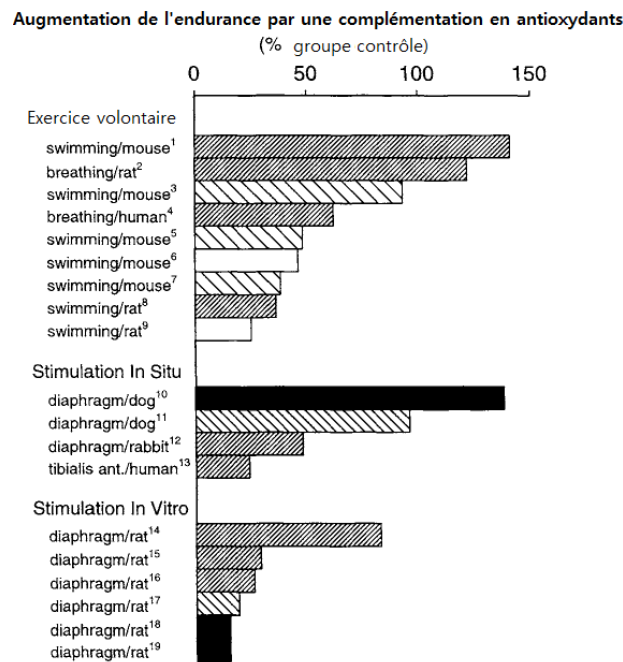
Ces ROS augmentent significativement la capacité contractile des fibres musculaires non fatiguées, et sont donc essentiels à l'effort musculaire. Cela peut s'expliquer par une augmentation de la perméabilité des canaux calciques via l'oxydation réversible de leur groupe sulhydryles par certains ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet (Reid, Khawli, Moody 1993). Mais nous allons voir que leur présence peut aussi aggraver les affections musculaires, et que leur accumulation peut avoir des effets délétères sur le tissu musculaire squelettique.

En effet, des études menées chez l'homme et le rat ont montré que le stress oxydatif musculaire pouvait être un facteur aggravant des rhabdomyolyses d'effort, notamment lors d'un déficit en vitamine E et en glutathion (Reid 2000).

En revanche, chez le chien il n'y a pas de preuve d'une corrélation entre le stress oxydatif et les rhabdomyolyses d'effort, Nous avons vu dans la première partie de ce travail qu'il existait de nombreux facteurs favorisant des rhabdomyolyses d'efforts, et il est supposé que le stress oxydatif soit seulement un facteur aggravant des lésions engendrées.

Le stress oxydatif est aussi un facteur clé de la fatigue musculaire au cours d'un effort de longue durée. La fatigue musculaire est définie comme une diminution réversible de la capacité contractile du muscle pendant ou après un exercice. Il a été montré sur des rats et des hommes qui nagent, mais également *in situ* sur des diaphragmes de chiens, que la production de ROS par un muscle fatigué était délétère pour la fonction contractile du muscle et à l'origine d'une augmentation de cette fatigue. Cela pourrait être dû à l'accumulation des ROS ainsi que des produits d'oxydations des biomolécules, dans les cellules musculaires au court de l'effort.

A l'inverse, les enzymes antioxydantes, la vitamine E, la N-acétyl-cystéine et le glutathion ont montré de bons résultats sur l'augmentation de la capacité contractile du muscle lors d'un effort long, et permettent donc une augmentation de l'endurance comme il est possible de voir sur la Figure 29 (Piercy et al. 2001).



*Figure 29 : Les antioxydants (vitamine E, N-acétyl-cystéine, glutathion et enzymes antioxydantes) diminuent la fatigue musculaire et augmentent l'endurance*

Les ROS ont donc un effet bénéfique pour la contraction du muscle non fatigué via l'augmentation de la perméabilité des canaux calciques, et deviennent délétères lors de leur accumulation liée à un effort prolongé.

## ii. Lésions des globules rouges

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la modification de la structure membranaire des globules rouges pendant et suite à un exercice chez l'homme (Lippi, Sanchis-Gomar 2019), chez le cheval (Portier 2007), et le chien (Motta et al. 2009), en lien avec le stress oxydatif.



En effet ces études ont permis de mettre en évidence chez le chien (Motta et al. 2009) et chez le cheval (Portier 2007) des corrélations entre la diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes et l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif, notamment des marqueurs de la peroxydation lipidique, lors d'un exercice. Or la capacité de déformation du globule rouge, et sa fonction de transporteur d'oxygène dépendent de la dynamique membranaire, et sont donc perturbés par une diminution de la fluidité membranaire.

Chez l'homme il a été montré que la fragilité des membranes plasmique des globules rouge était augmentée pendant un exercice d'endurance, et que cela était corrélé au fait que la durée de vie des globules rouges des coureurs était 40% inférieure à celle des hommes qui ne courent pas. La lyse de ces globules rouges est induite par des causes mécaniques comme les contractions musculaires ou la vasoconstriction des organes internes, lorsque les membranes des globules rouges sont fragilisées par le stress oxydatif. Ce dernier contribue donc à déclencher, accélérer et amplifier ce phénomène d'érythrolyse menant à ce qui est appelé l'« anémie du sportif » (Lippi, Sanchis-Gomar 2019).

Or il a été montré que cette hémolyse en lien avec un exercice de longue durée, pouvait être à l'origine d'une augmentation du stress oxydatif, en favorisant l'auto-oxydation de l'hémoglobine. Cette auto-oxydation de l'hémoglobine est une oxydation non réversible du  $Fe^{2+}$ , en  $Fe^{3+}$ , de l'hémoglobine, ce qui provoque la perte de sa capacité à fixer le fer, et donc la formation de méthémoglobine. En conditions physiologiques, le  $Fe^{2+}$  s'oxyde lors de sa fixation avec une molécule d'oxygène, en produisant un anion superoxyde, puis est réduit de nouveau lors du relargage de la molécule d' $O_2$ . Cependant en cas d'hémolyse, la réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  après la libération de la molécule d'oxygène ne se produit pas, ce qui génère de la méthémoglobine et un anion superoxyde. Cet anion va à son tour oxyder d'autres oxyhémoglobines, en générant le puissant radical hydroxyle ainsi que du peroxyde d'hydrogène. Il a également été supposé qu'en cas d'excès de peroxyde d'hydrogène, il pouvait y avoir libération du fer de l'hème, qui pourrait alors participer aux réactions de Fenton, et amplifier ainsi le stress oxydatif. Ainsi l'auto-oxydation de l'hémoglobine en cas d'hémolyse induit la production de radicaux hydroxyles, d'anions superoxydes et de peroxydes d'hydrogène (Caron 1999).

Il a également été montré que l'apport de vitamine E avait un rôle antioxydant clé dans la protection des membranes des érythrocytes, et que leur structure était significativement moins altérée lors d'une supplémentation en vitamine E (Motta et al. 2009) (Portier 2007).

### iii. Les diarrhées liées à l'effort

Les diarrhées apparaissant pendant ou à la suite d'un effort ont plusieurs étiologies. Il a été mis en évidence chez l'homme que le phénomène d'ischémie-reperfusion était le principal mécanisme physiopathologique à l'origine de symptômes gastro-intestinaux tels que la diarrhée (de Oliveira, Burini, Jeukendrup 2014).

Cependant du fait de la difficulté d'étude des phénomènes d'ischémie-reperfusions gastrointestinales pendant un exercice, aucune étude n'a permis de montrer un tel phénomène chez le chien de sport (Davis et al. 2003). Il est donc seulement supposé aujourd'hui que les phénomènes d'ischémie-reperfusion pourraient être en lien avec l'apparition des diarrhées chez le chien de traîneau pendant un exercice (Davis et al. 2005).

Chez l'homme il est bien établi que l'ischémie-reperfusion au cours d'un effort amène à des lésions de la paroi intestinale selon 2 mécanismes principaux :

- Par une forte diminution des réserves énergétiques des cellules du muscle lisse intestinale et des cellules nerveuses qui l'innervent, ce qui mène à une perturbation du fonctionnement cellulaire et donc à une diminution de la motricité intestinale,
- Par une forte production de ROS durant la phase de réoxygénation, qui vont exacerber les lésions cellulaires, et augmenter la perméabilité intestinale,

Les ROS sont aussi à l'origine d'un phénomène appelé « no-reflow » - signifiant « pas de reperfusion » – qui a été montré in vivo. Celui-ci consiste en une diminution du flux sanguin dans le système gastro-intestinal suite à la reperfusion des viscères abdominaux.

Ce phénomène s'explique par les lésions de l'endothélium vasculaire, notamment l'œdème péri vasculaire qui collabe les capillaires, provoqués par les ROS produits dans l'endothélium lors de la reperfusion, mais s'explique également par une diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes qui sont alors moins déformables.

Ce phénomène, par diminution du rayon des capillaires et diminution de la déformabilité des globules rouges, diminue donc le débit sanguin au niveau de l'intestin, et augmente le temps d'ischémie et donc les lésions de la paroi intestinale.

Il a été montré chez des rats que la supplémentation alimentaire en antioxydants permettait de diminuer les lésions endothéliales, et ainsi prévenir le phénomène de « no-reflow » et diminuer les lésions gastrointestinales liées à l'ischémie-reperfusion (Olguner, Aktug, Zer 2002).

En résumé, s'il n'est pas clairement établi aujourd'hui que l'ischémie-reperfusion soit à l'origine des diarrhées chez les chiens de traîneau, il est fortement suspecté sur la base des études menées chez le rat et chez l'homme, que ces diarrhées soient aggravées par les ROS produits lors de la reperfusion du tractus digestif.

#### iv. Insuffisance rénale

Une étude menée chez des triathlètes a montré que la redistribution du flux sanguin au cours d'un exercice de forte intensité était à l'origine d'une forte diminution du flux sanguin rénal et d'un phénomène d'ischémie reperfusion rénale. Ce phénomène d'ischémie-reperfusion à l'origine d'une inflammation et d'un stress oxydatif dans le parenchyme rénal, s'accompagne de lésions des tubules rénaux (Sugama et al. 2015). Le stress oxydatif apparaît donc ici comme un facteur aggravant des lésions rénales induites lors d'un exercice, en lien avec un hypoperfusion rénale. Cependant une telle diminution du flux sanguin rénal n'a pas été mise en évidence chez le chien de sport.

Inversement, il a été montré chez l'homme que l'exercice aérobique régulier avait un effet bénéfique à long terme sur les personnes atteintes d'insuffisance rénale chronique en diminuant le stress oxydatif rénal grâce à l'augmentation en nombre et en activité des systèmes antioxydants (Sugama et al. 2015).

Le stress oxydatif provoqué par un exercice intense peut mener pendant, ou après l'exercice, à une altération de différents tissus comme le muscle squelettique, la paroi intestinale, les globules rouges et les tubules rénaux. Il a été montré qu'une supplémentation en antioxydants permettait de limiter ses lésions, notamment celles de la membrane plasmique des globules rouges (Motta et al. 2009), de l'endothélium des capillaires (Olguner, Aktug, Zer 2002) et des fibres musculaires (Piercy et al. 2001). Nous discuterons donc dans la suite de ce travail de l'intérêt et de la gestion de l'apport d'antioxydants chez le chien de traîneau.

## 2. A longs termes

Les conséquences délétères à longs termes du stress oxydatif sont principalement en lien avec l'activation de certains facteurs de transcription modulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. L'inflammation ainsi générée par le stress oxydatif est mise de jeu dans de nombreuses maladies chroniques (Hussain et al. 2016).

### i. Effets cancérigènes

Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les ROS ont un effet cancérigène direct en oxydant de nombreuses biomolécules cellulaires dont l'ADN, qui peut subir des coupures, des mutations, des liaisons aberrantes et des mutations. Cela peut aboutir à la modification de gènes suppresseurs de tumeur, et donc à la transformation néoplasique des cellules.

Les ROS ont aussi un effet cancérigène indirect en activant de multiples facteurs de transcription comme le NF-κB qui est un facteur de prolifération cellulaire. Ils ont également un effet pro-inflammatoire via l'activation de facteurs de transcriptions de certaines cytokines pro-inflammatoires. Or il a également été montré que l'inflammation chronique était largement impliquée dans la cancérogénèse.

Il a ainsi été montré que les ROS, par des mécanismes très variés, étaient impliqués dans les différentes phases de la tumorigénèse (Reuter et al. 2010).

Bien que nous ayons vu que l'exercice pouvait être à l'origine d'un stress oxydatif, une étude menée chez des souris a permis de mettre en évidence une diminution de l'incidence des tumeurs et une augmentation de la durée de vie des souris soumise à un exercice aérobic régulier. Il a été montré que cette diminution de l'incidence des tumeurs était due à une augmentation de la capacité antioxydante des cellules et à une augmentation de leur homéostasie, ainsi qu'à l'activation de facteurs anti-inflammatoires (Nilsson et al. 2019).

Des études menées chez l'homme ont montré des résultats similaires quant à la diminution de l'incidence des tumeurs chez les coureurs réguliers, qu'il s'agisse de courtes, moyennes et longues distances. En revanche il est beaucoup plus délicat d'attribuer cette diminution seulement à la réalisation d'un exercice régulier, puisqu'ici il y a très probablement d'autres facteurs qui diffèrent, tels que le mode de vie et l'alimentation, entre le groupe de coureurs et le groupe de non coureurs étudiés (Sormunen et al. 2014).

Le stress oxydatif chronique a donc bien un effet cancérigène, mais il ne semble pas que cela soit le cas chez les sportifs réguliers, de par l'activation par l'exercice de facteurs cellulaires protecteurs anti-cancéreux, antioxydants et anti-inflammatoires. Il semble donc que l'effet protecteur cellulaire d'un exercice régulier prédomine par rapport à l'effet délétère du stress oxydatif engendré par cet exercice.

## ii. Dégénérescence oculaire

L'exposition constante de l'œil aux radiations, à l'oxygène et aux polluants atmosphériques, amène à une production de ROS accru dans les différentes structures oculaires. Il a été montré que le stress oxydatif induit par ces facteurs environnementaux était impliqué dans les affections tels que le glaucome, la cataracte, les uvéites, et différentes formes de rétinopathies (Ohia, Opere, LeDay 2005).

Il a été montré que la puissance des UV étaient corrélés à la gravité des affections oculaires (Ivanov et al. 2018) Or les chiens de traîneau travaillent de façon régulière en extérieur, et très fréquemment sur la neige qui reflète une part importante des radiations ultra-violettes. Ils semblent donc que les conditions d'exercice favorisent l'exposition régulière à des radiations lumineuses de fortes intensités, qui nous l'avons vu, peuvent générer un stress oxydatif et des lésions oculaires.

### iii. Dégénérescence du système nerveux central

Chez l'homme il a été montré que le stress oxydatif était un facteur favorisant l'apparition de certaines maladies dégénératives du système nerveux central telles qu'Alzheimer et Parkinson.

Or chez l'homme il a également été montré que le maintien prolongé d'une hyperoxie normobare, lors d'un exercice prolongé et intense, pouvait avoir des conséquences délétères au niveau du système nerveux central, en favorisant notamment la production de ROS et de peroxydes lipidiques.

L'ajout d'antioxydants comme les vitamines E et C et le glutathion à l'alimentation permet de prévenir les lésions cérébrales en lien avec le stress oxydatif (Somani, Husain 2000).

Même s'il n'a pas été démontré que de telles lésions pouvaient être engendrées par l'exercice chez le chien, il a été établi que le cerveau du chien était sensible aux lésions oxydatives des lipides et des protéines, qui s'accumulent notamment avec l'âge (Head et al. 2002). Il a également été montré que ces lésions pouvaient être en lien avec un déclin cognitif chez le chien âgé, à l'origine de comportements compulsifs. Ces lésions cérébrales peuvent être ralenties par une nourriture enrichie en antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C et les caroténoïdes (Roudebush et al. 2005).

On peut donc émettre l'hypothèse qu'il existe également chez le chien une hyperoxie normobare lors de l'exercice de haute intensité, qui, s'il est prolongé, pourrait être à l'origine de lésions oxydatives des lipides et protéines cérébrales.

Cependant, cela ne serait plus vrai lors d'efforts sous-maximaux, puisqu'il a été montré chez l'Homme qu'un exercice régulier et modéré permettait au contraire de diminuer le risque de maladies neurodégénératives, en favorisant les systèmes antioxydants et le renouvellement cellulaire, en lien avec la production de ROS au cours de l'effort (Radak et al. 2016).

Le stress oxydatif est donc un élément clef de certaines affections engendrées par l'exercice. En effet, ses effets délétères sur les membranes plasmiques, l'ADN et les protéines notamment, amènent à une aggravation des lésions tissulaires. S'il est plus difficile d'établir un lien entre le stress oxydatif généré par l'exercice et des affections apparaissant à long terme, comme certaines affections du système nerveux central par exemple, le lien entre le stress oxydatif induit par l'exercice et certaines affections aiguës comme les diarrhées d'effort ou les rhabdomyolyses, a été mis en évidence dans de nombreuses études.

Un apport en antioxydants chez les chiens de traîneau apparaît donc nécessaire afin d'armer au mieux les différents tissus face au stress oxydatif, et ainsi de les préserver des lésions d'oxydation.

## E. Principaux outils de caractérisation du stress oxydatif

Afin d'étudier le stress oxydatif *in vivo* ou *in vitro*, il existe de nombreuses techniques qui permettent de quantifier et de caractériser ce stress. Ces techniques sont notamment utilisées dans des études ayant pour but de comprendre les origines du stress oxydatif, mais aussi ses conséquences. Enfin, ces outils sont également un moyen de montrer l'efficacité de compléments antioxydants. Nous allons donc étudier dans cette partie les principaux outils dont nous disposons aujourd'hui pour caractériser le stress oxydatif.

### 1. Méthodes directes d'évaluation du stress oxydatif : dosages des ROS et des composés pro-oxydants

Etant donné que le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes, celui-ci aboutit à un excès de ROS dans l'organisme. Nous allons voir que certaines techniques permettent de doser directement les ROS produits, et qu'étant donné la très haute réactivité des ROS, et leur durée de vie très courtes, ces techniques sont principalement réalisées sur des modèles *in vitro*, et nécessitent d'être rapides et sensibles quant à la détection des ROS.

D'autres analyses donnent accès au dosage et à l'évaluation de l'activité de certains agents pro-oxydants, ce qui permet d'évaluer indirectement le taux de ROS dans l'organisme.

#### i. Résonance paramagnétique électronique (RPE)

La résonance paramagnétique électronique est la technique de choix pour détecter des radicaux libres *in vitro*. Cette technique repose sur les propriétés du spin de l'électron célibataire des radicaux libre. En effet, le spin de l'électron célibataire n'étant pas annulé par le spin opposé d'un électron apparié, les radicaux libres sont des composés paramagnétiques, c'est-à-dire qu'ils se caractérisent par une susceptibilité magnétique - qui est la faculté d'un matériau à s'aimanter sous l'action d'un champ magnétique - supérieure à zéro. Cette propriété permet à ces espèces chimiques d'être détectées, identifiées et quantifiées par l'application d'un champ magnétique et d'une onde électromagnétique, *id est* par RPE.

La limite de cette technique est la disparition très rapide des radicaux libres dans les tissus, qui peuvent donc ne plus être présents dans les tissus étudiés au moment des mesures par RPE. L'autre limite est le manque de spécificité de cette technique du fait que certains radicaux ont le même spectre d'absorption comme l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$ , les radicaux thiyls  $RS^{\bullet}$ , peroxydes  $ROO^{\bullet}$  et alcoxydes  $RO^{\bullet}$  par exemple (Asmus 2000).

La méthode de « spin trapping » permet de pallier les limites de la RPE simple, citées précédemment. En effet cette technique consiste à piéger les radicaux grâce à des molécules qui les convertissent en radicaux plus facilement et spécifiquement détectables et de durée de vie allongée. On peut citer l'exemple des nitrones, qui sont capables de réagir rapidement avec un radical  $R^\bullet$  pour former un radical nitroxyle, selon la réaction schématisée dans la Figure 30. Le radical nitroxyle est généralement très stable et une analyse par RPE est ensuite réalisée, et permet en général d'identifier finement le radical  $R^\bullet$  (Asmus 2000).

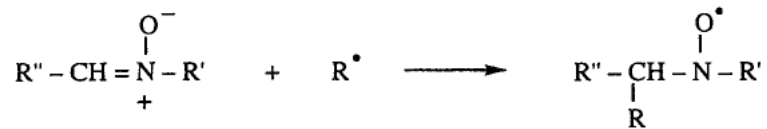


Figure 30 : Méthode du spin trapping : utilisation d'un nitronne pour piéger un radical  $R^\bullet$  (Asmus 2000)

## ii. La chimioluminescence

Comme la technique de RPE, la chimioluminescence trouve principalement un intérêt dans l'étude de modèles in vitro. Elle repose sur le fait que la plupart des radicaux sont colorés, dans le domaine du visible, de l'infra-rouge ou de l'ultra-violet, détectables par spectroscopie. Elle peut également mettre en jeu des réactions chimiques entre des molécules adjuvées et les ROS, à l'origine d'une production de molécules luminescentes ou fluorescentes (Asmus 2000).

Pour l'oxygène singulet, il est par exemple possible d'utiliser une méthode de chimioluminescence directe qui mesure la lumière de 1270 nm de longueur d'onde émise lors de la désintégration des atomes d'oxygène singulet. Cette émission de photon étant particulièrement faible, elle est indétectable dans la cellule, et ne peut être évaluée qu'à la surface des cellules ou encore sur des organites isolés (Koh, Fluhr 2016).

Un autre exemple est celui de la quantification des peroxydes d'hydrogènes présents dans un échantillon, par la réaction du 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, qui est une sonde qui émet une fluorescence rouge lorsqu'elle subit une réaction d'oxydation. Cette méthode est très sensible lorsque la horseradish peroxydase est ajoutée en même temps que la sonde.

## iii. Dosages des oligo-éléments

Nous avons vu précédemment que les oligo-éléments pouvaient devenir des éléments pro-oxydants s'ils s'accumulent dans l'organisme. Ainsi il est intéressant de doser notamment le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse plasmatiques lorsqu'on s'intéresse au statut redox d'un individu. Ces dosages peuvent être réalisés par spectrométrie d'absorption atomique (Pinta, 1973). Celui qui nous intéresse plus particulièrement dans l'étude du stress oxydatif est le fer, en tant que catalyseur de la réaction de Fenton.

Son dosage a par exemple permis de mettre en évidence une augmentation significative de 32% du fer libre LM-Fe dans le sang après un exercice physique intense chez 14 hommes sportifs réguliers. Il est suspecté que cette augmentation du LM-Fe soit due aux lésions tissulaires engendrées par l'exercice.

Le dosage tissulaire du Fe a permis de mettre plus spécifiquement en évidence une augmentation du taux de LM-Fe dans le muscle gastrocnémien des rats entraînés et non entraînés après un exercice intense. Cette augmentation a été corrélée à une augmentation significative de la peroxydation lipidique. Outre son activité pro-oxydante, le LM-Fe libéré dans le muscle par l'exercice est ensuite utilisé pour la synthèse de myoglobine ou bien excrété dans la transpiration ou l'urine (Jenkins, Beard 2000).

#### iv. Dosages des enzymes pro-oxydantes

Il existe de nombreuses méthodes permettant de quantifier les enzymes pro-oxydantes dans un tissu, mais également de mesurer leur activité. Ces techniques ont par exemple permis de comprendre l'intérêt des myéloperoxydases dans les phénomènes inflammatoires (Thomas 1979), ou encore de déceler l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase dans le muscle lors d'un exercice (Bedard, Krause 2007). Ces découvertes apportent non seulement une meilleure compréhension du stress oxydatif, mais offrent aussi des perspectives quant aux moyens de lutte contre celui-ci.

On peut citer l'exemple de l'enzyme myéloperoxydase présente dans les lysosomes des leucocytes, dont le dosage est intéressant pour caractériser des phénomènes infectieux et inflammatoires. Chez le cheval, un dosage des MPO présentes dans du liquide synovial a pu être réalisé par la technique ELISA, et l'évaluation de l'activité de ses MPO a été réalisée par la technique SIEFED. La technique ELISA repose sur la quantification des anticorps anti-MPO liés aux MPO présentes dans le tissu. La technique SIEFED quant à elle repose sur 3 étapes : la première est identique à la technique ELISA et consiste à mettre en contact les MPO et les anticorps anti-MPO. La seconde étape est un lavage afin de ne garder que les MPO liées aux anticorps. Enfin, du peroxyde d'hydrogène est introduit dans le milieu, ainsi que le réactif rouge Amplex<sup>TM</sup> qui joue le rôle de donneur d'électron et est converti en un composé hautement fluorescent par action de la MPO. Un suivi de la fluorescence est ensuite réalisé et permet de révéler l'activité des MPO présentes dans les tissus auxquels on s'intéresse (Wauters et al. 2013). Des méthodes colorimétriques peuvent être utilisées pour suivre l'activité d'autres enzymes comme la NADPH oxydase, pour laquelle le pyrogallol rouge peut être utilisé. Ce produit réagit avec l'anion superoxyde produit par la NOX, et permet ainsi un suivi colorimétrique de son activité catalytique oxydante (Cortés-Ríos et al. 2017).



Ainsi, les techniques d'études des enzymes pro-oxydantes sont multiples. Elles reposent sur différentes méthodes qui peuvent consister à quantifier directement les enzymes présentes, ou bien à quantifier les réactifs qu'elles consomment ou encore les produits qu'elles génèrent.

Ces études apportent beaucoup à la compréhension du stress oxydatif, et permettent de détecter très précocement l'apparition de ce dernier. Cela permet notamment de détecter des situations physiologiques générant des ROS, qui peuvent ensuite disparaître par l'action précoce des systèmes antioxydant.

Mais nous avons également vu que les méthodes directes étaient difficilement applicables à l'étude du stress oxydatif in vivo, notamment à cause de l'instabilité des ROS. De plus, ces techniques permettent de quantifier les ROS produits, mais ne permettent pas de mettre en évidence les lésions qu'ils génèrent. C'est pourquoi l'étude du stress oxydatif et donc la génération de ROS est aujourd'hui largement réalisée indirectement, c'est-à-dire par dosages des produits résultants de l'interaction entre les ROS et les biomolécules comme l'ADN, les lipides et les protéines (Thannickal, Fanburg 2000). Cependant la détection des produits d'oxydation n'étudie que des marqueurs tardifs du stress oxydatif. Ainsi, il est intéressant de combiner les méthodes directes et indirectes pour étudier tous les acteurs du stress oxydatif dans l'organisme.

## *2. Méthodes indirectes d'évaluation du stress oxydatif : dosage des produits de l'oxydation*

### *i. Produits d'oxydation des lipides*

Les produits d'oxydation des lipides sont probablement les plus étudiés des produits liés à l'attaque des ROS. Nous avons vu que les phospholipides membranaires, parmi lesquels les acides gras polyinsaturés, sont des constituants majeurs des membranes cellulaires et sont très susceptibles de réagir avec les ROS produits en grand nombre à proximité des membranes. De plus l'oxydation des acides gras polyinsaturés entraîne des réactions en chaînes qui augmentent significativement les dégâts oxydatifs des membranes.

Ainsi l'étude des produits de l'oxydation des lipides est essentielle pour étudier les dégâts oxydatifs générés par les ROS dans l'organisme (Zwart et al. 1998). Ces produits sont très nombreux, et les plus étudiés en tant que marqueurs de la peroxydation lipidique sont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyalkenal (HNE), les alcanes, les diènes conjugués et les isoprostanes représentés sur la Figure 31.

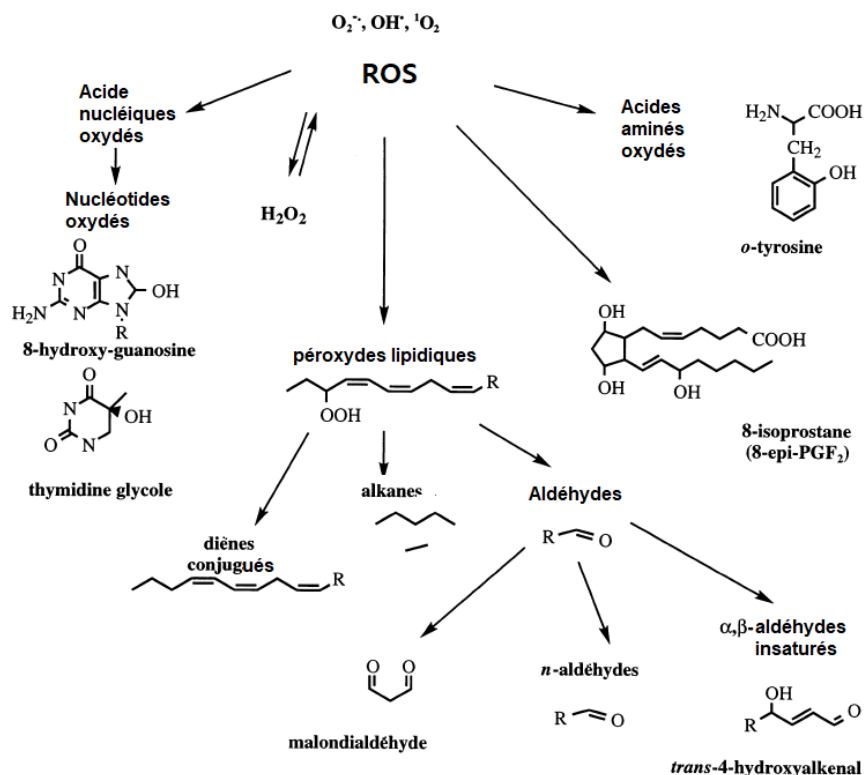


Figure 31 : Produits résultant d'une oxydation par les ROS (Zwart et al. 1998)

#### a. Dosage des aldéhydes

Nous avons vu que les aldéhydes, dont le MDA et le HNE, étaient des produits d'oxydation des acides gras polyinsaturés présents principalement dans les membranes. Ce sont des molécules relativement stables qui peuvent traverser la membrane plasmique et engendrer des dégâts oxydatifs à distance de leur lieu de formation. Leurs propriétés font des aldéhydes de bons marqueurs de la peroxydation lipidiques (Zwart et al. 1998).

Le plus utilisé de ces marqueurs est le MDA, qui est sous forme libre, ou lié à des protéines dans les systèmes biologiques. Il existe plusieurs techniques permettant de doser le MDA dans l'urine, le plasma ou dans des prélèvements tissulaires. Les plus utilisées sont le TBA-assay et la méthode HPLC.

Le TBA-assay est une méthode colorimétrique qui repose sur la liaison entre l'acide thiobarbiturique – TBA – et le MDA et le spectre d'absorption de la molécule TBA-MDA formée peut être évalué à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour former cette liaison le MDA doit être sous sa forme libre, pour cela l'échantillon est fortement acidifié. Cette méthode présente plusieurs inconvénients, du fait de sa faible spécificité tout d'abord, puisqu'il existe une trentaine d'autres molécules cellulaires ayant le même spectre d'absorption, et ainsi lorsqu'on dose le MDA par cette méthode, on dose également ces autres molécules, dont font partie les alk-2-enals par exemple. De plus ce spectre d'absorption peut varier en fonction des conditions du milieu, comme le pH et la température. Du fait de sa faible spécificité, la méthode du TBA est plus adaptée à la réalisation d'études in vitro que d'études in vivo.

Une seconde méthode utilisée est la méthode de l'HPLC, qui signifie en anglais High Performance Liquid Chromatography. C'est une méthode à la fois sensible et spécifique qui permet de mesurer le taux de MDA dans de nombreuses expériences, et une grande diversité d'échantillons (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

De même le HNE peut être dosé par la méthode HLPC, après conjugaison avec le dinitrophenylhydrazine, abrégé DNPH.

Il existe d'autres méthodes comme la chromatographie gazeuse ou encore des méthodes immunologiques pour doser le MDA, le HNE, ainsi que d'autres aldéhydes, que nous ne détaillerons pas dans ce travail.

Le dosage du MDA a permis de mettre en évidence la peroxydation lipidique lors de certaines affections telle que des lésions cardiaques d'ischémie-reperfusion chez le rat, et d'infarctus du myocarde chez l'homme.

Il a également été montré chez l'homme (Zwart et al. 1998) et chez le chien (Motta et al. 2009) que l'exercice entraînait une augmentation significative du MDA urinaire et plasmatique et qu'une supplémentation en vitamine E permettait de diminuer ce taux.

Ainsi le MDA est un marqueur reconnu du stress oxydatif, et son dosage par la méthode HPLC est fréquemment utilisé dans le cadre d'étude réalisées sur des organismes vivants (Zwart et al. 1998).

#### b. Dosages des diènes conjugués

Les peroxydes lipidiques possèdent une structure caractérisée par leurs doubles liaisons séparées par une seule liaison simple, ce qui fait d'eux des diènes conjugués. Ces diènes absorbent les UV d'une longueur d'onde de 234 nm, c'est pourquoi la mesure des diènes conjugués est fréquemment réalisée par spectrophotométrie ou par HPLC ultra-violet. L'inconvénient de la méthode spectrophotométrique, est comme pour le TBA-assay, un manque de spécificité du fait de la présence d'autres molécules absorbant la même longueur d'onde (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000). Par exemple, il a été montré chez l'homme qu'une grande partie, ou la totalité, du spectre obtenu par HPLC était lié à la présence d'un isomère de l'acide linoléique, ce dernier n'ayant pas de rapport avec les processus de peroxydation lipidique (Halliwell, Chirico 1993).

La méthode HPLC a tout de même été utilisée dans des études visant à identifier in vitro les phospholipides et les cholestérols oxydés lors de l'oxydation des LDL.

Le dosage des diènes conjugués peut être utilisé pour l'analyse de modèles in vitro, mais présente un manque de sensibilité et de spécificité qui diminue l'intérêt de son utilisation pour l'étude de la peroxydation lipidique in vivo (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

### c. Mesure des alcanes expirés

Les alcanes sont des chaînes de carbones liés à des atomes d'hydrogènes seulement, ce sont des produits dérivés de la peroxydation lipidique.

L'éthane et le pentane, possédant respectivement 2 et 5 atomes de carbone, sont les alcanes volatiles les plus utilisés pour évaluer la peroxydation lipidique (Zwart et al. 1998).

L'individu sur lequel le test est réalisé doit expirer dans un ballon dont la matière est dite inerte vis-à-vis des alcanes. Le gaz est ensuite analysé par chromatographie gaz-liquide (Kneepkens, Lepage, RoY 1994).

Chez l'homme, la mesure des alcanes expirés est notamment utilisée pour comprendre l'implication de la peroxydation lipidique dans certaines affections telles que l'arthrite rhumatoïde, l'infarctus du myocarde, et des colites ulcéreuses. Une corrélation a été établie entre le taux d'éthane expiré et le degré de sévérité de ces maladies (Zwart et al. 1998).

Chez l'homme il a également été montré que le taux de pentane expiré était significativement augmenté après un exercice d'endurance, et que celui-ci était proportionnel à l'intensité de l'effort chez des coureurs cyclistes (Ji 1995). Il a été montré qu'une supplémentation en vitamine E permettait de diminuer les taux de pentanes expirés lors d'un effort (Kneepkens, Lepage, Roy 1994).

Les limites de la méthode sont représentées par les nombreuses causes d'artéfacts possibles. Tout d'abord les taux d'éthane et de pentane expirés ne sont pas toujours représentatifs du taux de production d'alcanes endogènes du fait de la présence d'alcanes dans l'air ambiant. Cela nécessite donc de faire respirer à l'homme ou à l'animal un air dépourvu d'alcanes préalablement à l'expérience. Cela rend l'examen difficile à pratiquer en routine du fait de son caractère contraignant. De plus, cette technique ne permet pas d'étudier l'origine des alcanes expirés, ce qui représente une limite à son utilisation pour l'étude de maladies spécifiques (Zwart et al. 1998).

### d. Dosage des LDL oxydés

Chez l'homme, l'oxydation des LDL revêt une grande importance du fait de sa participation à l'athérogénèse, le chien est quand-à-lui beaucoup moins touché par cet affection, puisqu'il est dit « athéro-résistant » (Robinson, Robinson 2016).

Nous avons vu que l'oxydation des LDL était mesurable par analyse des phospholipides et des cholestérol estérifiés oxydés par détection UV en HPLC.

Il est également possible de quantifier les LDL oxydés présents dans un échantillon par un dosage immuno-enzymatique avec l'anticorps monoclonal 4E6 se fixant aux apolipoprotéines oxydées des LDL. Ces mesures sont principalement réalisées chez l'homme pour le diagnostic et l'étude de certaines maladies cardio-vasculaires comme l'athérosclérose (Gradinaru et al. 2015).

#### e. Dosage des F2-isoprostanes

Les F2-isoprostanes sont des isomères, chimiquement stables, des prostaglandines, et sont produites au cours de la peroxydation lipidiques de l'acide arachidonique par les ROS. Elles sont retrouvées sous forme libre dans des milieux tels que le plasma et l'urine. Ainsi elles peuvent être mesurées dans ces liquides selon différentes techniques. La première que nous citerons est la technique de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse – abrégée GC-MS –, qui est peu réalisée en pratique car elle nécessite un matériel très spécifique. Il est aussi possible de doser les F2-isoprostanes par un test ELISA, ce qui est plus facile à réaliser, et nécessite un matériel moins spécifique (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000), mais aussi par des méthodes radio-immunologiques (Cracowski et al. 2000).

Une augmentation du taux d'isoprostane a été montré dans diverses maladies, comme l'athérosclérose ou le diabète (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000), mais également lors d'un exercice d'entraînement chez le chien de traîneau (Hinchcliff et al. 2000). De plus ce taux augmente rapidement lors d'un stress oxydatif, et est donc un marqueur précoce de ce dernier (Zwart et al. 1998).

Ainsi les F2-isoprostanes semblent être de bons marqueurs pour l'étude du stress oxydatif du fait de la précocité de leur apparition dans le plasma et l'urine à la suite d'un stress oxydatif, mais aussi de la facilité à réaliser les prélèvements sanguin ou urinaire, ainsi que de la difficulté modérée et de la bonne sensibilité du test ELISA.

#### f. Mesure de la fluidité membranaire des érythrocytes par RPE

Nous avons vu précédemment que la fluidité de la membrane des érythrocytes pouvait diminuer en lien avec un stress oxydatif généré par un exercice par exemple. Ainsi la fluidité membranaire des érythrocytes est un marqueur indirect du stress oxydatif qu'il peut être intéressant d'étudier chez l'homme ou chez l'animal réalisant un exercice, et qui est représentatif, au moins partiellement des lésions oxydatives des membranes dans l'organisme.

L'analyse de la fluidité membranaire repose sur l'analyse de la dynamique des lipides par Résonance paramagnétique électronique (RPE) dont nous avons étudié précédemment l'utilisation pour l'étude des espèces radicalaires. Cette technique spectroscopique hertzienne utilise des sondes extrinsèques paramagnétiques qui sont des analogues structuraux d'acides gras, dont l'acide doxyl-stéarique, qui vont s'intégrer dans les membranes érythrocytaires et ainsi permettre d'en déterminer la dynamique lipidique profonde, c'est-à-dire la fluidité membranaire, et le degré d'organisation plus superficiel, par mesure de la résonance des spins électroniques avec un spectromètre. Ces paramètres sont significativement modifiés suite à des attaques radicalaires qui rigidifient les membranes et en diminuent la fluidité (Motta et al. 2009). Cette méthode est réalisée sur sang total sur anticoagulants, car elle nécessite de travailler sur des érythrocytes vivants, et requiert un lavage préalable des érythrocytes.

L'avantage de cette technique est que les prélèvements sanguins sont relativement simples à réaliser, en revanche elle nécessite un matériel très spécifique.

## ii. Produit de l'oxydation de l'ADN : Dosage du 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 8OH-dG

Le lien entre l'exercice et les dommages oxydatifs de l'ADN a été établi par de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal.

Le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine – abrégé 8OH-dG – est un produit généré lors de la réparation de l'ADN ayant subi des dommages oxydatifs. Il a été largement étudié comme biomarqueur des dommages de l'ADN car il est capable de s'apparier de façon incorrecte avec l'adénine à la place de la cytosine lors de la réplication de l'ADN. Cette propriété fait de lui le principal facteur responsable de mutations spontanées de l'ADN (Hartmann 2000). Le 8OH-dG libre présent dans le plasma est rapidement filtré par le rein, et est ainsi retrouvé dans l'urine.

Le dosage du 8OH-dG est donc réalisé dans l'urine, selon plusieurs méthodes : la méthode de l'HPLC et la technique de GC-MS, qui sont toutes les deux des méthodes très sensibles, mais qui nécessitent un appareillage spécifique et coûteux, le spectromètre de masse. Les étapes d'extraction et d'hydrolyse de l'ADN pour la réalisation de la méthode HPLC nécessitent des précautions drastiques puisqu'il y a un fort risque d'oxydations « parasites » des constituants de l'ADN lors de ces étapes.

De nombreuses méthodes enzymatiques ont été également réalisées pour le dosage de 8OH-dG avec l'utilisation d'anticorps anti-8OH-dG (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

Enfin, il est également possible d'évaluer quelles sont les types et le nombre de lésions de l'ADN suite à un stress oxydatif, par l'utilisation notamment du test comet. Cette technique consiste en une électrophorèse sur gel d'agarose. Elle a été notamment utilisée chez l'homme pour étudier les lésions de l'ADN des leucocytes après l'effort et a permis de montrer la réparation correcte de l'ADN après un exercice (Hartmann 2000).

## iii. Dosage des produits de l'oxydation des peptides et protéines

Nous avons étudié précédemment les dommages oxydatifs liés à l'attaque des ROS sur les protéines et les peptides lors d'un stress oxydatif. Ces lésions peuvent être évaluées par le dosage de certains des produits d'oxydation tels que les disulfures, les protéines thiolées, les protéines carbonylées, et les acides aminés oxydés (Figure 32).

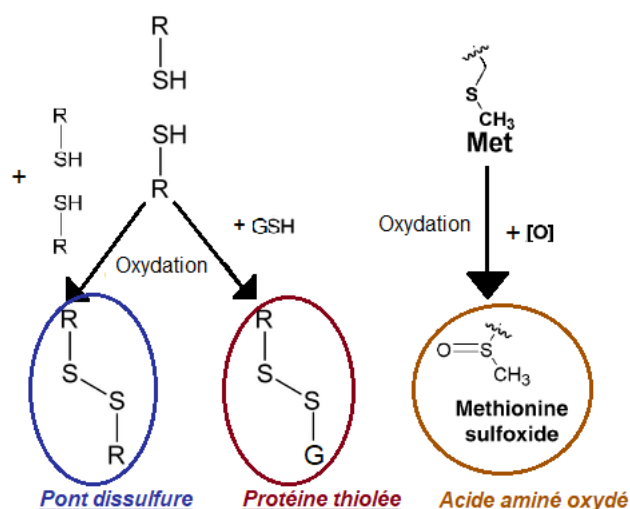


Figure 32 : Produits de l'oxydation des protéines quantifiables dans les systèmes biologiques (Peytoureau F., 2020)

- **Rapport thiol / disulfures** : En condition physiologique la plupart des thiols sont sous forme réduite dans la cellule. Lors d'un stress oxydatif, le taux de thiol oxydés, appelés disulfures, augmente dans la cellule.

Ce rapport peut être déterminé dans des échantillons biologiques avec des marqueurs tels que le 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), noté DTNB, puis analyse spectrophotométrique.

La méthode RPE peut aussi été utilisée pour la détermination du statut rédox des thiols.

- **Protéines thiolées** : Les protéines thiolées résultent de l'addition non enzymatique du glutathion GSH sur une protéine à groupement thiol, lors d'un stress oxydatif cellulaire. Pour doser ces protéines thiolées dans les systèmes biologiques, il est possible d'utiliser la cystine radiomarquée. Elle diffuse dans les cellules, où elle est réduite en cystéine puis incorporée aux GSH. Les GSH radiomarqués s'activent lorsqu'ils se lient à un thiol. Cela permet donc d'estimer le nombre de protéines thiolées.

L'addition du GSH aux thiols est une réaction réversible qui arrive précocement lors d'un stress oxydatif.

Les protéines thiols participent à la régulation du statut rédox des cellules. La diminution de leur taux dans les cellules ou dans le plasma est donc un signe précoce de stress oxydatif, puisqu'une fois oxydées, les protéines thiols sont éliminées.

- **Protéines carbonylées** : Nous avons vu que les groupes carbonyles C=O se forment par réaction des acides aminés avec les ROS lors d'un stress oxydatif.

Pour doser ces protéines carbonylées, il est possible d'utiliser le 2,4-dinitrophenylhydrazine qui réagit avec les groupements carbonyles des protéines, pour former une molécule identifiable par spectrophotométrie. Cette méthode a permis de montrer notamment que le taux de carbonyles dans les cellules augmentait avec l'âge et certaines maladies neurodégénératives par exemple. Cette technique a l'inconvénient d'être peu spécifique et très peu reproductible.

Le manque de spécificité de cette technique vient du fait que les groupements carbonyles eux-mêmes ne sont pas des marqueurs spécifiques du stress oxydatif. En effet ils sont aussi formés par glycosylation des protéines, et sont aussi présents dans les acides nucléiques et les lipides. Or l'extraction de ces molécules, dans le but de ne détecter que les protéines carbonylées, est difficile en pratique. Ainsi le dosage des protéines carbonylées dans le but d'étudier le stress oxydatif est aujourd'hui controversé.

- Acides aminés oxydés : Les acides aminés oxydés sont des produits très divers de l'oxydation des protéines. La plupart des acides aminés oxydés sont spécifiques de l'oxydation des protéines lors d'un stress oxydatif, et peuvent être étudiés par méthode HPLC ou GC-SM. Il a été montré que de nombreuses affections, telles que l'athérosclérose ou des maladies inflammatoires des poumons, étaient associées à une augmentation du taux d'acides aminés oxydés. La limite de cette technique repose sur la difficulté d'étudier l'oxydation de plusieurs acides aminés sur le même échantillon.

Malgré cela, la spécificité des acides aminés oxydés vis-à-vis du stress oxydatif, fait de celui-ci un bon marqueur pour l'étude du stress oxydatif in vivo (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

Les produits de l'oxydation des lipides, de l'ADN et des protéines sont donc de bons marqueurs du stress oxydatif in vivo, et permettent aussi de rendre compte des dégâts biomoléculaires liés à ce stress. Nous avons vu que certains de ces tests pouvaient être réalisés sur des prélèvements tels que de l'urine et le sang, et peuvent donc être utilisés facilement chez l'animal. L'étude de la fluidité membranaire des érythrocytes et du MDA plasmatique ont d'ailleurs été étudiés sur des chiens de sport lors d'exercice d'endurance, et ont permis de montrer une augmentation significative de la peroxydation lipidique au cours de l'effort avec une augmentation du MDA plasmatique (Lenzi 2011) et une diminution de la fluidité membranaire des érythrocytes (Tissier 2011).

### *3. Evaluation du statut antioxydant*

Pour étudier le stress oxydatif et le déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes, il est intéressant d'étudier les mécanismes, le nombre et l'activité des défenses antioxydantes. De multiples études ont notamment étudié les variations de nombre et d'activité des défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques lors de l'exercice. Nous allons maintenant nous intéresser aux différentes méthodes d'études des systèmes antioxydants.



## i. Dosage sanguin et évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

Nous avons vu qu'un exercice de forte intensité était à l'origine d'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, et notamment de la SOD, de la GPX, et de la CAT. Nous allons étudier dans ce paragraphe les méthodes d'études de l'activité de ces enzymes dans le sang.

La SOD est une enzyme centrale pour la défense cellulaire antioxydante, du fait de sa capacité à neutraliser les radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet-}$ .

Des variations du nombre de SOD dans les tissus, ainsi que des variations de son activité, ont été objectivées dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques, comme l'exercice physique de forte intensité, qui nous l'avons vu entraîne une augmentation de l'activité de la SOD. Cette augmentation a pu être mise en évidence dans le tissu musculaire et les globules rouges.

Pour évaluer ces paramètres, de nombreuses méthodes de mesures sont décrites, avec de grandes variations de sensibilité entre chaque méthode (Powers, Sen 2000). Un exemple est l'évaluation de l'activité de la SOD présentes dans les globules rouges, par suivi spectrophotométrique de l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol. Cette auto-oxydation se produit en présence de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  et donc en l'absence de SOD, et produit un composé pouvant être détecté par spectrophotométrie (Marklund, Marklund 1974).

Des méthodes immunochimiques telles qu'un ELISA sandwich permettent également de déterminer la nature et le nombre de SOD présentes dans les cellules (Powers, Sen 2000).

La GPX et la CAT sont également des enzymes clef des systèmes biologiques antioxydants, par la réduction du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et des hydroperoxydes LOOH. Une augmentation de l'activité de la GPX présente dans les érythrocytes a été mise en évidence suite à un exercice, ce qui n'est pas le cas pour la CAT, dont l'activité est augmentée seulement dans le muscle squelettiques (Deaton, Marlin 2003, p. ). Les méthodes d'évaluation de leur activité dans les globules rouges reposent également sur un suivi spectrophotométrique. Pour la GPX, un exemple de méthode utilisée est le suivi de la consommation du GSH par la GPX au cours du temps par polarographie (Wendel 1981).

Pour la CAT, l'évaluation de son activité repose sur le suivi spectrophotométrique de la consommation du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  au cours du temps (Beers, Sizer 1952).

## ii. Dosage de quelques antioxydants marqueurs du stress oxydatif

L'évaluation de systèmes antioxydants non enzymatiques est également intéressant pour comprendre leur répartition dans l'organisme et leurs variations quantitatives lors de certaines situations physiologiques et pathologiques. Nous avons vu précédemment que les taux d'antioxydant plasmatique avaient tendance à diminuer avec l'exercice, et que leur suivi permettait d'évaluer par exemple l'efficacité de compléments antioxydantes chez l'homme ou l'animal sportif.

Ainsi nous allons étudier dans cette partie les méthodes de dosage du GSH, de la vitamine E, de la vitamine C, de l'acide urique et de l'ubiquinone.

- Evaluation du rapport GSH/GSSG : Le GSH représente la majorité des thiols cellulaires, et possède de nombreuses fonctions, dont celle d'antioxydant cellulaire que nous avons étudiée précédemment. L'intervention du GSH dans d'autres fonctions cellulaires fait que sa présence cellulaire ne varie pas seulement en fonction du stress oxydatif, mais peut varier en fonction du cycle cellulaire par exemple. C'est pourquoi il est préférable de mesurer le rapport GSH/GSSG, bien plus spécifique du stress oxydatif. Ce rapport est habituellement de 100/1, mais peut très fortement diminuer en cas de stress oxydatif cellulaire, ce qui fait de ce rapport un bon marqueur du stress oxydatif.

Le dosage GSH/GSSG nécessite une préparation de l'échantillon, sanguin par exemple, afin que le ratio ne soit pas modifié après prélèvement. L'acidification de l'échantillon par de l'acide perchlorique par exemple, au moment de son prélèvement, ou immédiatement après, empêche que le GSH réagisse, et permet donc de conserver le rapport GSH/GSSG.

L'estimation du rapport peut ensuite être déterminé par différentes méthodes. Nous citerons dans ce travail les méthodes spectrophotométrique et HPLC, qui ont l'avantage d'être très sensibles et spécifiques.

La méthode spectrophotométrique repose sur la séparation des thiols protéiques et du GSH, puis sur des réactions mettant en jeu le DTNB, les GSH, les GSSG, la GSH réductase et le NADPH qui permettent d'obtenir le nombre total de glutathion réduit et oxydé, GSH + GSSG, par analyse spectrophotométrique du TNB produit. L'analyse d'un deuxième échantillon dans lequel le GSH est rendu inerte par ajout de N-éthylmaléimide, est nécessaire pour avoir la quantité de GSSG. Ainsi à partir du nombre total de glutathion oxydé et réduit GSH + GSSG, et du nombre de GSSG, il est possible de calculer le rapport GSH/GSSG.

La détermination de GSH/GSSG par la détection électrochimique en HPLC est très sensible également. L'avantage de cette méthode est la possibilité de quantifier d'autres thiols dans le même échantillon (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

- Dosage de la vitamine E : De nombreuses études s'intéressent au dosage de l'isoforme  $\alpha$ -tocophérol de la vitamine E dans le plasma car elle est l'antioxydant le plus puissant pour la protection des membranes, et sa présence est cruciale dans des situations générant un stress oxydatif. Il a été montré qu'étant donné son recyclage permanent par la vitamine C et l'ubiquinone, la diminution du taux sanguin de vitamine E est un marqueur tardif du stress oxydatif, et n'arrive qu'après une consommation totale de la vitamine C. Nous avons vu qu'une telle diminution pouvait survenir lors d'un exercice intense, chez le chien de traîneau en course d'endurance par exemple.

Afin d'empêcher l'oxydation de la vitamine E après prélèvement, l'utilisation d'antioxydants est nécessaire. Ainsi un milieu de prélèvement apolaire tel que l'hexane ou l'heptane, avec ajout d'un antioxydant tel que la vitamine C, est souvent utilisé. La vitamine E est ensuite dosée le plus souvent par détection électrochimique, UV ou de fluorescence en HPLC. Parmi ces méthodes, la détection électrochimique est la plus sensible (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

- Dosage de l'ubiquinone: Nous avons vu que l'ubiquinone était un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, et qu'il avait également un rôle clef pour la protection des membranes mitochondriales et plasmiques lors d'un stress oxydatif.

Comme pour la vitamine E ou le glutathion, le statut redox de l'ubiquinone est fréquemment utilisé comme marqueur du stress oxydatif.

Le milieu d'extraction de l'ubiquinone peut être le même que celui utilisé pour la vitamine E, que nous avons cité dans le paragraphe précédent. L'ubiquinone est moins stable que la vitamine E, et réagit à température ambiante, il est donc nécessaire de plonger rapidement le prélèvement dans la glace afin d'éviter son oxydation.

Le dosage de l'ubiquinone est réalisé le plus souvent selon 3 méthodes : détection UV, UV et électrochimique, ou électrochimique seulement, par HPLC. La détection électrochimique de l'ubiquinone par HPLC est une méthode très sensible, en revanche la détection UV est peu sensible. L'utilisation de l'HPLC présente l'avantage de pouvoir doser l'ubiquinone, la vitamine E et les  $\beta$ -carotènes dans le même échantillon (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

- Dosage de la vitamine C: La vitamine C est un puissant antioxydant plasmique. L'étude du taux plasmique de vitamine C a permis de montrer que ce taux a été diminué lors d'un stress oxydatif généré par la fumée de cigarette ou un exercice par exemple.

La vitamine C est très instable dans les prélèvements sanguins et s'oxyde très vite de façon irréversible. Afin d'empêcher cette oxydation, il est nécessaire d'acidifier fortement le milieu de prélèvement, avec de l'acide m-phosphorique par exemple, ou de congeler le plus froid possible, par exemple il a été montré que la vitamine C était stable 21 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Le dosage de la vitamine C peut se faire par méthode HPLC ou par spectrophotométrie. La méthode de choix est la détection électrochimique par HPLC, qui possède une très bonne sensibilité et spécificité et qui de plus, permet un dosage simultané de l'acide urique, qui est un autre antioxydant (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

### iii. Mesure de la capacité antioxydante globale plasmatique

Il est également possible d'évaluer la capacité antioxydante globale du plasma, cela permet de donner une idée globale du statut antioxydant de l'organisme. Pour cela de multiples méthodes ont été utilisées, dont la plupart reposent sur le suivi quantitatif de la réduction d'une molécule ajoutée au plasma (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000). Par exemple, dans une étude menée chez le chien de traîneau, la capacité antioxydante globale plasmatique a été mesurée par capacité des antioxydants plasmatiques à réduire les ions  $\text{Cu}^{2+}$  en ions  $\text{Cu}^+$ . Cela a permis de montrer que la supplémentation en myrtille augmentait significativement la capacité antioxydante plasmatique chez le chien de traîneau (Dunlap, Reynolds, Duffy 2006)

La limite de cette méthode est le fait qu'il n'est pas possible de savoir quels sont les antioxydants plasmatiques à l'origine de la réduction de la molécule étudiée. En effet, l'augmentation du taux de l'un des antioxydants peut très bien masquer la diminution des taux d'un autre, sans affecter le résultat global. Le pouvoir antioxydant total peut donc être sur- ou sous-estimé voire même non corrélé au stress oxydatif réellement subi.

De plus il a été montré qu'il y avait une forte variabilité de résultats entre les différentes méthodes, et que celles-ci sont moins sensibles que les méthodes de dosages d'antioxydants spécifiques que nous avons étudiés précédemment (Han, Loukianoff, McLaughlin 2000).

## 4. *Corrélation entre les paramètres biochimiques et le stress oxydatif*

Des études ont permis de mettre en évidence un lien entre le stress oxydatif lié à l'exercice et la variation de certains paramètres biochimiques que sont la créatinine kinase, l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase et les protéines C réactives. Nous allons étudier pour chacun de ces paramètres la cause de l'augmentation de leur activité ou concentration dans le plasma lors d'un exercice.

Cette analyse nous permettra d'analyser les résultats des analyses biochimiques réalisées lors de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc dans la partie expérimentale de ce travail.

#### ❖ La créatinine kinase :

Définition : La créatinine kinase – notée CK – est une enzyme synthétisée par les muscles squelettiques, le myocarde et le cerveau. Il existe 3 isoformes de CK : l'isoforme MM est présent dans le muscle squelettique, l'isoforme MB est présent dans le myocarde et l'isoforme BB est présent dans le cerveau. Il est possible de distinguer les différents isoformes par dosage immunologique, mais en pratique vétérinaire courante seule la créatinine kinase totale est dosée.

La concentration plasmatique de la CK ne dépend que des lésions musculaires et myocardique. La CK est donc un bon marqueur lorsqu'on cherche à identifier des lésions musculaires lors d'un exercice par exemple, en revanche elle ne permet pas d'identifier la cause et l'origine exacte de la souffrance musculaire.

Augmentation de la concentration des CK en lien avec l'exercice : Chez l'homme il a été supposé que les lésions oxydatives des membranes des cellules musculaires liées à un exercice de forte intensité, étaient à l'origine d'une augmentation de la concentration plasmatique en créatinine kinase. En effet après une course de 80 km, il existe une corrélation entre l'augmentation du MDA plasmatique et des CK chez les coureurs (Kanter et al. 1988).

L'augmentation des CK suite à une course peut être liée également à d'autres lésions musculaires telles que des déchirures ou des contractures musculaires.

Chez le chien de traîneau, il a été montré que l'augmentation des CK dans le plasma était significativement corrélée à l'augmentation de la concentration plasmatique en isoprostane, qui, nous l'avons vu, est un bon marqueur de la peroxydation lipidique. Les lésions oxydatives des cellules musculaires chez le chien de traîneau lors d'une course peuvent donc être à l'origine d'une augmentation du taux plasmatique de CK (Hinchcliff et al. 2000).

Valeurs usuelles de la créatinine kinase plasmatique : **0-10 U/L**

#### ❖ Les ASAT :

Définition : L'ASAT est une enzyme présente à la fois dans le cytosol (20%) et les mitochondries (80%) des cellules de nombreux tissus mous, dont le cœur, le foie, les muscles, les globules rouges et les reins chez le chien. Une augmentation de l'activité plasmatique des ASAT est souvent le reflet de lésions de nécrose ou d'inflammation hépatique ou musculaire. L'origine tissulaire exacte peut parfois être déterminée par dosage concomitant d'autres enzymes plus spécifiques, comme l'ALAT pour les lésions hépatiques et la CK pour les lésions musculaires.

Dans les fibres musculaires dites « lentes », l'activité ASAT est importante et contribue à assurer un turn-over rapide des acides aminés.

L'augmentation de l'activité plasmatique des ASAT est un bon marqueur des lésions hépatiques et musculaires.

Augmentation de la concentration des ASAT en lien avec l'exercice : Il a été montré chez des coureurs, qu'une course de 100 km, qui représente donc un exercice extrême, était à l'origine d'une augmentation significative des ASAT, ALAT, CRP et CK (Jastrzębski et al. 2015). De la même façon, nous pouvons supposer que les lésions oxydatives des membranes plasmatiques des cellules hépatiques et musculaires pourraient être à l'origine d'une augmentation de ces paramètres biochimiques.

Valeurs usuelles des ASAT plasmatiques : **0-50 U/L**

#### ❖ Les ALAT :

Définition : L'ALAT est une enzyme cytosolique présente principalement dans le foie, et minoritairement dans le cœur et les reins. L'augmentation de l'activité plasmatique des ALAT peut être le signe de lésions hépatocellulaires, avec augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes. Cette activité peut être multipliée par 100 en cas d'inflammation ou de nécrose hépatique, et l'augmentation est proportionnelle au nombre d'hépatocytes touchés.

Augmentation de la concentration des ALAT en lien avec l'exercice : De même que pour les ASAT, un exercice extrême, représenté dans l'étude par une course de 100km, entraîne une augmentation de l'activité plasmatique des ALAT chez l'homme (Jastrzębski et al. 2015). De la même façon nous pouvons supposer que les lésions hépatiques provoquées par l'exercice peuvent être, au moins en partie, liées à la fragilisation des membranes des hépatocytes par les ROS.

Valeurs usuelles des ALAT plasmatiques : **0-40 U/L** On considère qu'il y a une cytolyse hépatique à partir de **80 U/L**.

#### ❖ Les CRP :

Définition : Les CRP sont des homopentamères, de synthèse exclusivement hépatique, régulée par les interleukines IL 1 et TNF $\alpha$ . C'est donc une protéine apparaissant précocement lors d'une inflammation, chez le chien et chez l'homme.

L'intensité de l'augmentation des CRP dans le sang dépend du type d'inflammation. Dans le cas d'une inflammation non liée à un processus septique, l'augmentation reste modérée.

Augmentation de la concentration des CRP en lien avec l'exercice : Nous avons vu que lors d'un exercice, le stress oxydatif était à l'origine de lésions vasculaires, provoquant notamment une augmentation de la perméabilité des vaisseaux. Or une étude chez l'homme a permis de mettre en évidence que les lésions vasculaires engendrées par un stress oxydatif étaient corrélées à une augmentation des CRP plasmatiques (Cottone et al. 2006).

Nous avons également étudié précédemment le lien entre les lésions et l'inflammation musculaires et le stress oxydatif provoqué par un exercice de forte intensité. Chez l'homme il a été montré qu'un exercice de longue durée tel qu'un marathon provoquait effectivement une augmentation des CRP plasmatiques (Takayama et al. 2018).

Une telle augmentation a également pu être objectivée chez des chiens de traîneau après une course de 557 km. Nous pouvons supposer que cette augmentation des CRP suite à une course de longue distance et de forte intensité peut être en partie liée au stress oxydatif généré par l'effort (Wakshlag et al. 2010).

Valeurs usuelles des CRP : **< 10 mg/L**

Pour conclure, il existe de nombreuses méthodes permettant d'explorer le stress oxydatif, par le dosage d'éléments pro-oxydants, antioxydants, ou encore des produits d'oxydation générés par le stress oxydatif. De nombreuses techniques permettent de réaliser ces dosages dans le sang ou l'urine et sont ainsi facilement applicables pour des études in vivo, que ce soit chez l'homme ou l'animal. Nous avons vu que certaines d'entre elles comme la mesure du MDA plasmatique, de la fluidité membranaire des érythrocytes, de l'activité d'enzymes antioxydantes, de la vitamine E et C du pouvoir antioxydant global plasmatique, ont pu être réalisées sur les chiens de traîneau en course d'endurance afin d'évaluer le stress oxydatif.

Le Tableau V résume l'ensemble des techniques de dosages que nous avons étudiées dans cette partie :

*Tableau V : Exemples de molécules et leurs techniques de dosages, permettant d'étudier le stress oxydatif in vivo (Peytoureau F., 2020)*

Produits dosés	Exemples de méthodes de dosage
<b>ROS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ RPE et spin trapping</li> <li>❖ Chimiluminescence</li> </ul>
<b>Exemples d'enzymes pro-oxydantes :</b>	
• MPO	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Dosage par ELISA</li> <li>❖ Evaluation de l'activité par la technique SIEFED</li> </ul>
• NOX	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Evaluation de l'activité par utilisation du pyrogallol rouge et suivi spectrophotométrique</li> </ul>
<b>Produits de l'oxydation des lipides :</b>	
• Aldéhydes	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ TBA assay (Faible sensibilité)</li> <li>❖ HPLC (Bonne sensibilité)</li> </ul>
• Diènes conjugués	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Spectrophotométrie (Faible sensibilité)</li> <li>❖ Détection UV en HPLC (Méthodes peu spécifiques pour les études in vivo)</li> </ul>
• Alcanes expirés	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Chromatographie gaz-liquide (Manque de spécificité par contamination de l'air ambiant)</li> </ul>
• LDL oxydés	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Détection UV en HPLC des phospholipides et des cholestérol estérifiés oxydés</li> <li>❖ Dosage immuno-enzymatique</li> </ul>
• F2-isoprostanes	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ GC-SM</li> <li>❖ ELISA</li> </ul>
<b>Fluidité membranaire des érythrocytes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ RPE</li> </ul>
<b>Produits de l'oxydation de l'ADN : le 8OH-dG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ HPLC (Forte sensibilité)</li> <li>❖ GC-SM (Forte sensibilité)</li> <li>❖ Méthodes enzymatiques</li> </ul>

<b>Produits de l'oxydation des peptides et protéines :</b>	
• <b>Rapport thiol / disulfures</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ajout de DTNB puis analyse spectrophotométrique</li> <li>❖ RPE</li> </ul>
• <b>Protéines thiolées</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ajout de cystine radiomarquée</li> </ul>
• <b>Protéines carbonylées</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ajout de 2,4-dinitrophenylhydrazine puis analyse spectrophotométrique (Très peu spécifique et très peu reproductible)</li> </ul>
• <b>Acides aminés oxydés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ HPLC (Forte sensibilité et spécificité)</li> <li>❖ GC-SM (bonne sensibilité et spécificité)</li> </ul>
<b>Activité des enzymes antioxydantes :</b>	
• <b>SOD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Evaluation de l'activité par utilisation du pyrogallol rouge et suivi spectrophotométrique</li> <li>❖ Dosage par ELISA sandwich</li> </ul>
• <b>GPX et CAT</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ GPX : évaluation de l'activité par polarographie</li> <li>❖ CAT : suivi spectrophotométrique de la consommation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> </ul>
<b>GSH/GSSG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Ajout de DTNB puis analyse spectrophotométrique</li> <li>❖ Détection électrochimique en HPLC</li> </ul>
<b>Vitamine E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Détection électrochimique en HPLC (très bonne sensibilité)</li> </ul>
<b>Vitamine C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Détection électrochimique en HPLC (très bonne sensibilité et spécificité)</li> <li>❖ Spectrophotométrie</li> </ul>
<b>Ubiquinone et acide urique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Détection électrochimique en HPLC (très bonne sensibilité)</li> </ul>
<b>Capacité antioxydante globale plasmatique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Suivi de la réduction d'un atome ou d'une molécule, par exemple la réduction des ions Cu<sup>2+</sup> en ions Cu<sup>+</sup></li> </ul>
<b>Paramètres biochimiques libérés lors de lésions oxydatives tissulaires :</b>	
<b>CK, ASAT, ALAT, CRP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Pour ALAT et ASAT : méthode colorimétrique par exemple</li> <li>❖ Pour les CK : mesure de la cinétique enzymatique (dosage des NADPH produit par méthode spectrophotométrique à 340 nm)</li> <li>❖ Pour les CRP : immunoturbidimétrie par exemple</li> </ul>



## F. Les facteurs prédisposant au stress oxydatif chez les chiens de traîneau

Bien que nous ayons vu que l'organisme était capable d'adapter certaines de ses défenses antioxydantes au stress oxydatif généré par l'exercice, ce stress oxydatif est tout de même présent chez le chien de traîneau à l'entraînement ou en compétition. En effet des dosages réalisés lors de compétitions ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique par l'évaluation du MDA (Lenzi 2011), des isoprostanes (Hinchcliff et al. 2000) et de la fluidité membranaire des érythrocytes (Tissier 2011), ainsi qu'une augmentation de la dégradation de l'ADN par le dosage du 8OH-dG (Baskin et al. 2000).

Nous allons étudier dans cette partie les différents éléments physiologiques et environnementaux à l'origine d'une perte de l'homéostasie rédox et donc du stress oxydatif chez le chien de traîneau pendant une course.

### *1. Augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub>*

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que le chien de traîneau entraîné avait une VO<sub>2</sub> max élevée pouvant atteindre 198 mL/kg/min (Banse et al. 2007) et que sa consommation en oxygène durant l'effort augmentait considérablement en comparaison avec sa consommation d'oxygène basale, en réponse au besoin en oxygène des muscles pour la production d'ATP.

Chez le chien, une étude sur des muscles gastrocnémiens isolés a permis de montrer que la contraction musculaire était à l'origine d'une très forte augmentation de la consommation musculaire en O<sub>2</sub>, qui pouvait atteindre 30 fois sa consommation basale (Welch, Stainsby 1967).

Nous allons voir que cette augmentation de la consommation d'O<sub>2</sub> par l'organisme participe à l'augmentation de la production des ROS au cours de l'effort.

### *2. L'effort intense prolongé*

Nous avons vu que l'effort d'endurance et de forte intensité était permis par la production d'énergie par les voies aérobie et anaérobie lactique dans les cellules musculaires. La voie aérobie requiert un apport adapté et souvent conséquent en O<sub>2</sub> aux fibres musculaires.

### i. Les principales voies de production de ROS au cours de l'effort

De nombreuses voies de production de ROS ont été mises en évidence pendant l'exercice, et ce principalement dans le muscle. Peu d'études se sont intéressées à la production des ROS par d'autres organes pendant l'exercice chez l'homme et chez le chien, du fait la difficulté des analyses à réaliser in vivo (Powers, Jackson 2008). Mais il a été montré que la génération de ROS peut être le résultat de l'altération de certains tissus en lien avec un effort intense (Jackson 2000).

Les principaux sites de production des ROS dans le muscle sont :

- ❖ La chaîne respiratoire mitochondriale : Les muscles sont capables d'augmenter leur consommation d'oxygène par les chaînes respiratoires mitochondriales pour produire une quantité d'ATP adaptée à l'effort musculaire lors d'un exercice aérobie. Or nous avons vu que 2 à 5 % de l'oxygène entrant dans la chaîne respiratoire était oxydé en anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$ . Ainsi, une production accrue d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale et consécutivement une augmentation de la production de radical hydroxyle par la réaction de Fenton, ont pu être mis en évidence lors de contractions musculaires induites chez le chat (Jackson 2000).

De plus il a été montré que les muscles des athlètes humains pouvaient atteindre des températures de 41 à 45°C lors d'un exercice. Or il a été montré qu'à ces températures, le taux de production d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale augmentait significativement (Sachdev, Davies 2008).

Ainsi, l'augmentation d'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale participe à l'augmentation de la production de ROS dans le muscle lors d'un effort aérobie.

- ❖ Les xanthines oxydases : Nous avons vu que les XO sont un système clé de production des ROS lors de phénomène d'ischémie-reperfusion dans le myocarde et les muscles squelettiques lors d'un exercice. En effet, lors d'ischémie-reperfusion, il y a une perte de l'homéostasie calcique dans le tissu concerné, ce qui active des protéases calcium-dépendantes. Or ces protéases transforment les xanthines déshydrogénases en XO (Jackson 2000). Lors de la phase de reperfusion les XO sont capables de générer du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet -}$ , à l'origine d'une explosion oxydative. Chez des rats une inhibition de la XO réduit considérablement les dommages oxydatifs liés à l'exercice (Sachdev, Davies 2008).

Les XO participent donc à la production de ROS pendant l'exercice, et entraîne donc des dommages oxydatifs.

- ❖ Les cellules inflammatoires : Lors d'un effort intense ou de longue durée, les lésions musculaires provoquent l'arrivée dans le tissu musculaire de cellules inflammatoires, dont les polynucléaires neutrophiles et les macrophages, via le sang et le tissus interstitiel. Cette inflammation permet la réparation et la régénération des fibres musculaires. Cependant nous avons vu que les polynucléaires neutrophiles et les macrophages sont capables de produire des quantités importantes de ROS par ce qu'on appelle « l'explosion oxydative », et peuvent ainsi induire des dommages aux tissus sains environnants (Jackson 2000).  
Ainsi l'inflammation dans le muscle suite à un effort peut aggraver les dommages musculaires liés aux ROS.
- ❖ L'altération de l'homéostasie calcique : L'effort entraîne une augmentation de la concentration calcique cellulaire transitoire, et peut parfois mener à une dérégulation de l'homéostasie calcique. Ce phénomène est impliqué dans les lésions musculaires provoquées par un exercice intense, et également dans l'augmentation du taux de ROS cellulaires selon plusieurs modalités. Tout d'abord nous avons vu que l'augmentation de la concentration cellulaire en calcium active des protéases capables de générer la XO. Il a également été montré que cette augmentation pouvait modifier l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et ainsi augmenter la production d'anions superoxydes (Jackson 2000).
- ❖ L'altération des chélateurs du fer : Nous avons vu précédemment que l'exercice pouvait mener à une lyse des érythrocytes et ainsi à une augmentation du LM-Fe dans l'organisme. Il a également été montré que les cellules musculaires lésées lors d'un exercice, libéraient des molécules de myoglobines et secondairement du LM-Fe. Ainsi, il a été montré que les molécules contenant du fer participaient à l'augmentation des ROS dans l'organisme lors d'un exercice, et principalement des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (Jackson 2000).
- ❖ Les catécholamines : Lors d'un exercice, certaines catécholamines sont libérées, telles que l'adrénaline et la dopamine, et ont de nombreux rôles comme la régulation du métabolisme cellulaire ou du débit sanguin. Il a été montré que l'auto-oxydation des catécholamines mène à la formation de ROS. Elles représentent donc une autre source de ROS au cours de l'exercice (Jackson 2000).
- ❖ Les NADPH oxydases : Les isoformes NOX2 et NOX4 présentent dans les muscles squelettiques sont également considérées comme une source majeure de ROS pendant l'exercice (Kozakowska et al. 2015).

Il existe donc de nombreuses voies de production de ROS lors d'un effort intense et long, comme celui fourni par le chien de traîneau lors des courses de moyennes distances de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc. Nous allons voir dans la suite de ce travail que la production importante de ROS entraîne une variation de l'activité et du nombre de défenses antioxydantes de l'organisme.

## ii. Evolution des capacités antioxydantes au cours de l'effort

Nous avons vu que l'exercice entraînait une augmentation de l'activité des principales enzymes antioxydantes que sont la SOD, la GPX et la CAT.

Parallèlement il a été montré que le taux plasmatique de vitamine E (Hinchcliff et al. 2000) diminuait lors d'une course d'endurance chez le chien de traîneau. Quant à la vitamine C, il a été montré que son taux sanguin était augmenté tout de suite après un exercice (Piercy et al. 2000) et le Greyhound (Marshall et al. 2002), mais que ce taux diminuait fortement 24h après un exercice chez le Greyhound (Marshall et al. 2002), ce qui n'a pas été évalué chez le chien de traîneau.

Des mesures de la capacité antioxydante globale plasmatique ont également été effectuées chez des chiens de traîneau lors de courses, et l'impact de l'exercice sur ce paramètre reste incertain, puisqu'une étude a mis en évidence la baisse de cette capacité antioxydante globale après une course (Piercy et al. 2000), et une autre étude n'a pas permis de mettre en évidence de diminution significative de ce paramètre (Hinchcliff et al. 2000). Dans cette seconde étude il est supposé que la diminution de la vitamine E plasmatique soit compensée par l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes.

## iii. Le stress oxydatif dépend du type d'effort

Selon la théorie de l'hormesis, l'effort modéré et régulier serait à l'origine d'une augmentation des capacités antioxydantes, et aurait ainsi un effet bénéfique sur la santé des athlètes en diminuant le stress oxydatif.

Au contraire un effort extrême aurait des effets délétères en favorisant la production de ROS, en diminuant les capacités antioxydantes et en favorisant ainsi les lésions oxydatives tissulaires (Figure 33).

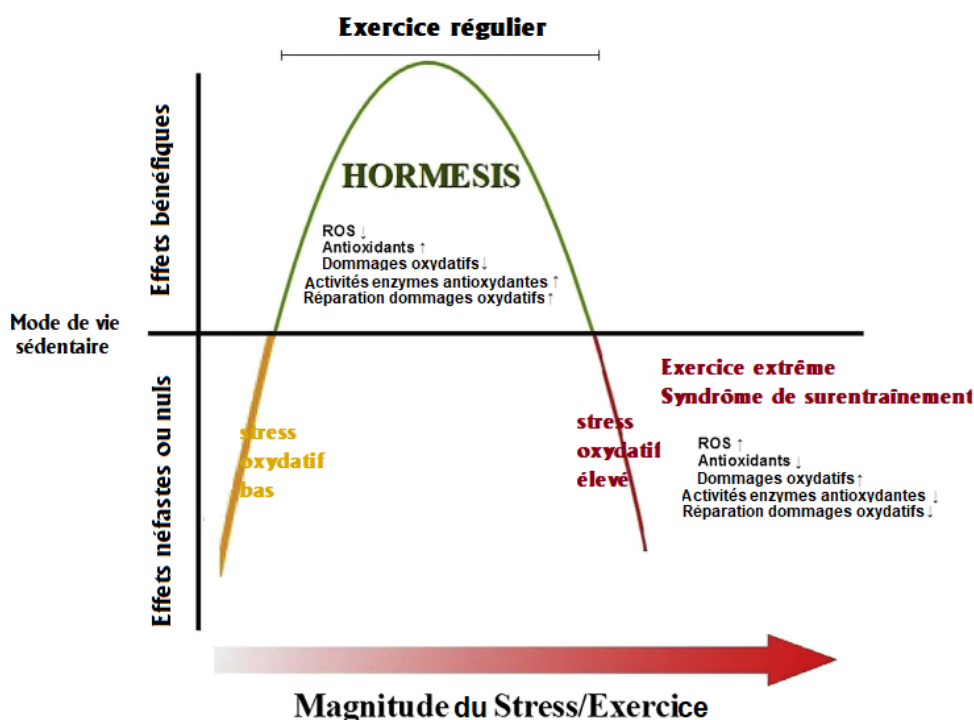


Figure 33 : Impact de l'intensité de l'exercice sur le stress oxydatif (Pingitore et al. 2015)

Cette influence de l'intensité de l'effort sur les capacités antioxydantes et pro-oxydantes sont tout de même à nuancer puisqu'il a été montré que les athlètes de très haut niveau, bien entraînés, voyaient tout de même leurs capacités antioxydantes augmenter lors d'un effort extrême tel qu'un Ironman, qui est un triathlon composé de 3.8km de natation, 42.195km de course à pied puis 180.2km de cyclisme (Pingitore et al. 2015).

Ainsi, si un effort de très forte intensité peut provoquer des lésions oxydatives chez un athlète, il a été montré qu'un entraînement bien mené permettait de limiter très fortement le stress oxydatif généré par cet effort (Pingitore et al. 2015).

### 3. L'altitude

Des études menées chez l'homme et chez le rat, ont permis de montrer que la diminution de la pression en oxygène avec l'altitude était, contrairement à ce que l'on pourrait penser, à l'origine d'une augmentation de la production de ROS dans l'organisme et donc de l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN. Il a également été montré que les dommages des biomolécules sont d'autant plus importants que l'altitude est élevée et que la période d'adaptation à l'altitude a été courte.

Ce phénomène s'explique notamment par un manque d'apport en oxygène au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui provoque une accumulation de composés réduits au niveau de la chaîne respiratoire. Les complexes réduits de la chaîne respiratoire, tels que l'ubiquinone, peuvent alors s'auto-oxyder et former ainsi des ROS.

Il a également été montré que l'exercice physique exacerbe le stress oxydatif généré par l'altitude (Dosek et al. 2007).

L'altitude pourrait donc être un facteur qui favorise l'apparition du stress oxydatif chez les chiens de traîneau participants à des courses en zone montagneuse, comme la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc.

#### *4. L'hyperthermie liée à l'effort*

L'hyperthermie chez le chien de sport a pu être mise en évidence chez des greyhounds après un sprint de 400 mètres. En effet, juste après l'effort la température rectale était de 41°C, et était de nouveau dans les valeurs usuelles 30 minutes après l'effort (Rose, Bloomberg 1989). Cette hyperthermie concerne également les muscles, dans lesquels nous avons vu précédemment que la température pouvait atteindre 41 à 45°C au cours de l'effort chez des athlètes humain.

Des muscles de rats isolés et soumis quelques minutes à une température de 42°C ont produit d'avantage d'anions superoxydes  $O_2^{\bullet-}$ . Cela a également pu être montré chez des coureurs dont la production de ROS et la peroxydation lipidique augmentait avec l'élévation de la température corporelle.

Les mécanismes de production de ROS induite par l'hyperthermie ne sont pas encore totalement élucidés, mais différentes origines ont pu être mises en évidence :

- Le pourcentage de production d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale augmente lors d'hyperthermie supérieure à 40°C
- L'activation des phospholipases, qui favorisent fortement la production de ROS dans le tissu musculaire
- L'augmentation de la production de ROS par les leucocytes soumis à une température supérieure à 40°C

L'hyperthermie peut donc augmenter la production de ROS dans différents tissus de l'organisme lors d'un exercice (King, Clanton, Laitano 2016).

#### *5. L'alimentation*

Les chiens de traîneau à l'entraînement et en compétition ont des rations très riches en lipides et en protéines, afin de couvrir leurs besoins énergétiques. Lors de courses de moyennes distances, ces besoins énergétiques sont multipliés environ par 2,5 par rapport au besoin de maintenance. Pour les efforts d'endurance, les chiens de traîneau nécessitent un apport accru en lipides et notamment en acides gras polyinsaturés comme il est indiqué sur la Figure 34, puisqu'ils constituent la source énergétique principale pour les muscles squelettiques lors d'un effort aérobie. Un apport en protéines est également essentiel pour la régénération des tissus musculaire et nerveux après l'effort, et représente également une source d'énergie pour les muscles (Taleux 2019).

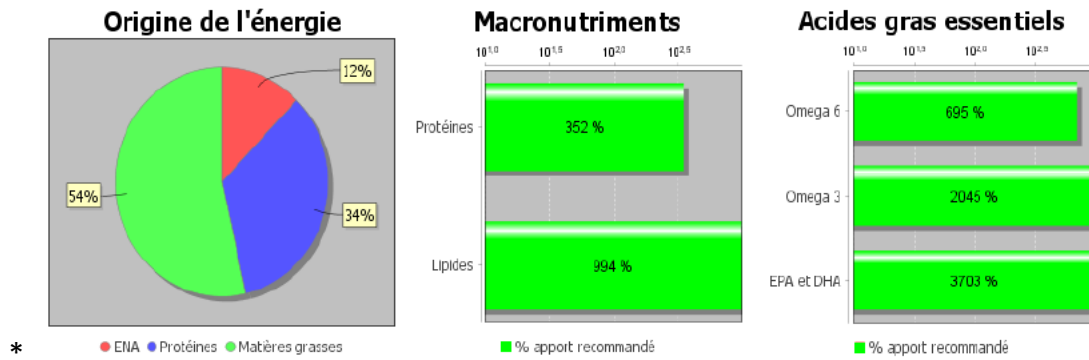


Figure 34 : Données cumulées de la ration de 2 attelages lors de la Grande Odyssee Savoie Mont-Blanc 2019 : Augmentation très importante des quantités d'acides gras polyinsaturés et protéines par rapport à la ration d'un chien de race et de poids équivalents, au repos (Taleux 2019)

Or il a été montré chez des chiens en bonne santé d'étudiants vétérinaires, qu'un apport accru en acide gras polyinsaturés dans l'alimentation était à l'origine d'une augmentation du taux d'acides gras plasmatiques, et d'une augmentation de la peroxydation lipidique, évaluée par une diminution du glutathion plasmatique et une augmentation des isoprostanes dans les urines (Walters et al. 2010).

Si le lien entre la composition de la ration et le degré de peroxydation lipidique chez les chiens de traîneau n'ont pas été encore étudié, il semble possible de déduire des études précédentes que la richesse en acides gras polyinsaturés des rations des chiens de traîneau en course et à l'entraînement peut être un facteur favorisant le stress oxydatif lié à l'exercice, via la formation d'hydroperoxydes et de radicaux peroxydes.

## 6. Le stress psychologique

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation du stress chez le chien de traîneau, notamment par une augmentation du taux de cortisol plasmatique. Ce stress peut être généré par l'effort lui-même, mais également par des changements environnementaux tels que le froid, le changement du rythme de vie, et la présence d'autres chiens. Cela est aussi vrai lors de la LGO, lors de laquelle les conditions de courses peuvent être anxiogènes du fait de l'attente avant les départs des courses, du bruit, du public et des transports fréquents par exemple (Royer et al. 2005).

Il a été montré que le stress généré par l'exercice pouvait mener à une production accrue de catécholamines chez le chien (Peronnet et al. 1982). Or nous avons vu que les catécholamines libérées lors d'un exercice pouvaient mener à une augmentation de la production de ROS par auto-oxydation (Jackson 2000).

## 8. La luminosité

En milieu montagneux, les rayonnements ultra-violet ont un indice supérieur, et l'abondance de la neige et des rochers favorisent la réflexion de ces UV, qui peuvent atteindre les tissus cutanés et oculaires (Askew 2002).

Or nous avons vu que les UV pouvaient générer un stress oxydatif au niveau des structures oculaires à l'origine de diverses affections comme la cataracte et le glaucome (Ivanov et al. 2018).

Les chiens de traîneau, et notamment ceux qui courent en montagne, sont donc plus à risque pour le développement de troubles oculaires liés aux UV.

Il existe donc de nombreux facteurs favorisant le stress oxydatif chez les chiens de traîneau participant à une course telle que la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc. Les principaux facteurs favorisant, précédemment détaillés, sont :

- ❖ La VO<sub>2</sub> max élevée
- ❖ La durée et l'intensité de l'effort
- ❖ La diminution des capacités antioxydantes
- ❖ L'altitude
- ❖ L'hyperthermie
- ❖ L'alimentation
- ❖ La luminosité

La partie suivante nous permettra d'étudier les différents antioxydants que nous avons à notre disposition afin de limiter le stress oxydatif chez le chien de traîneau à l'exercice.



### III. Antioxydants disponibles pour la prévention du stress oxydatif chez le chien de traîneau

Nous avons vu que l'effort générait un stress oxydatif à l'origine de lésions biomoléculaires et tissulaires chez le chien de traîneau à l'entraînement et en compétition. Cela signifie que l'exercice génère des ROS en excès par rapport aux défenses antioxydantes de l'organisme lors de l'effort. Il paraît donc important de pallier le manque de défenses antioxydantes par un apport exogène d'antioxydants, dont nous avons précédemment étudié les propriétés.

C'est pourquoi nous étudierons dans la partie suivante, ceux qu'il est possible d'utiliser chez le chien de traîneau, ainsi que leur efficacité dans la lutte contre le stress oxydatif généré par l'exercice.

#### A. Principaux anti-oxydants liposolubles et hydrosolubles apportés par l'alimentation

L'alimentation optimale doit apporter les nutriments qui assurent le développement et le maintien de l'organisme, un apport énergétique suffisant, et qui enfin, permettent de prévenir l'apparition de certains désordres tels que le stress oxydatif (Grandjean 2006).

Nous avons vu que les défenses antioxydantes cellulaires des chiens de traîneau pouvaient être dépassées lors d'un effort extrême. L'alimentation optimale du chien de traîneau devrait donc apporter des antioxydants en quantités suffisantes mais non excessives pour lutter contre le stress oxydatif généré par l'exercice.

##### 1. *La vitamine E*

Nous avons vu que la vitamine E était un antioxydant liposoluble qui protège efficacement les membranes contre le stress oxydatif du fait sa capacité à arrêter les chaînes de peroxydations lipidiques, et à neutraliser les ROS au sein des membranes (Grandjean 2001).

La vitamine E est apportée dans l'alimentation du chien de traîneau principalement par l'alimentation industrielle. Pour l'ajout de vitamine E dans les aliments, le stéréoisomère naturel RRR- $\alpha$ -tocophérol, qui est l'isomère ayant l'activité biologique la plus élevée, est fréquemment utilisé. On retrouve également une complémentation sous forme d'un mélange racémique des 8 stéréoisomères de synthèse, noté all-rac-alpha-tocopherol. Cette supplémentation doit donc être donnée en quantité suffisante afin d'assurer l'apport recommandé en vitamine E chez le chien de traîneau à l'entraînement ou en compétition, qui a été défini à 400 UI par jour chez un chien pesant entre 20 et 40 kg. Lors de régime à base de viande, les chiens sont très susceptibles de développer une hypovitaminose E pendant la course, et il est donc nécessaire de les compléter (Zink, Van Dyke 2018).

En effet la concentration en vitamine E des produits carnés est faible comparativement aux oléagineux par exemple. La concentration des produits carnés en vitamine E oscille entre 0,21 et 1,14 UI pour 100 grammes de viande. Pour atteindre les quantités recommandées de 400 UI, il faudrait donc qu'un chien de traîneau mange par exemple au minimum 350g de blanc de poulet chaque jour, qui est la viande la plus riche en vitamine E. Si un ajout de viande de bœuf est faite, cela diminue la teneur en vitamine E de la ration, puisque celle-ci contient seulement 0,21 UI/100g (Leonhardt, Gebert, Wenk 1997).

Chez des chiens de traîneau, une supplémentation en vitamine E, associée au  $\beta$ -carotène et à la lutéine, a permis de diminuer significativement les dégâts oxydatifs de l'ADN et d'augmenter significativement la capacité de résistance des LDL à l'oxydation (Baskin et al. 2000). Une autre étude menée chez des chiens sédentaires a montré qu'une supplémentation en vitamine E permettait de protéger les membranes érythrocytaires contre les dommages oxydatifs lors d'un exercice sous-maximal (Motta et al. 2009).

Un apport alimentaire en vitamine E semble donc intéressant pour aider l'organisme des chiens de traîneau à lutter contre le stress oxydatif, et plus particulièrement contre l'oxydation des lipides membranaires lors d'un exercice.

Pour être efficace, la vitamine E oxydée doit être recyclée, c'est-à-dire réduite. Pour cela, il est important que les antioxydants capables de recycler la vitamine E, tels que la vitamine C et le glutathion, soient en quantité suffisante dans l'organisme.

## *2. La vitamine C*

La vitamine C est un antioxydant hydrosoluble abondant dans l'organisme, et dont les propriétés antioxydantes découlent de sa capacité à neutraliser de nombreux ROS, mais aussi à recycler la vitamine E.

Chez le chien de traîneau elle peut être apportée par l'alimentation industrielle et dans les abats, et est aussi synthétisée par le foie (Grandjean 2001). Cependant il a été montré que cette synthèse n'était pas suffisante pour compenser la diminution du taux de vitamine C au cours de l'effort. En effet chez le chien de traîneau une diminution de 50% du taux plasmatique de vitamine C a été mise en évidence chez des chiens après une course d'une heure et demie. Il a été déduit de cette étude qu'une supplémentation orale en vitamine C pouvait être bénéfique lors d'un exercice. Il a été montré qu'une supplémentation d'un gramme par jour permettait de conserver une concentration plasmatique en vitamine C dans les normes, c'est-à-dire entre 5 et 6 mg/L.

D'autres études viennent cependant nuancer les effets bénéfiques de la vitamine C chez le chien de sport. Tout d'abord, une supplémentation orale à la dose d'un gramme par jour, pendant 4 semaines chez des Greyhounds, a provoqué une diminution significative des performances sportives, avec une baisse de 0,3 km/h en moyenne, chez les chiens supplémentés.

Il est cependant incertain que les résultats de cette étude puissent s'appliquer aux chiens de traîneau réalisant un effort sous-maximal, puisque les Greyhounds réalisent un effort de sprint de très courte durée, avec un métabolisme anaérobie presque exclusif.

Il a aussi été montré qu'à de trop fortes concentrations cellulaires, la vitamine C pouvait être pro-oxydante (Zink, Van Dyke 2018).

Si chez l'homme une supplémentation en vitamine C a montré un effet bénéfique pour la diminution des douleurs musculaires et une réparation des dommages musculaires plus rapide (Sen, Goldfarb 2000), chez le chien il n'est pour l'instant pas établi que cette supplémentation apporte de réel bénéfice pour diminuer les lésions en lien avec le stress oxydatif lors de l'effort (Zink, Van Dyke 2018).

### *3. La taurine*

Nous avons vu précédemment que la taurine est un acide aminé non protéinogène, synthétisé majoritairement dans le foie, et ayant des propriétés antioxydantes multiples telles que la neutralisation des ROS et la diminution de la peroxydation lipidique. Sa présence dans le muscle est également essentielle à la contraction des fibres musculaires, et favorise leur réparation suite à un exercice (Seidel, Huebbe, Rimbach 2019).

Elle est donc endogène, mais peut également être apportée par l'alimentation, notamment dans les poissons, mais aussi dans la viande, et est donc présente en quantité abondante dans la ration des chiens de traîneau.

Il a été montré chez l'homme, mais pas encore chez le chien, que la taurine était un très bon antioxydant qui permet notamment de protéger les membranes en cas de stress oxydatif lors d'un exercice. Il a également été montré que le taux de taurine musculaire diminuait après un effort de longue durée chez l'homme, et qu'un apport alimentaire prévenait cette diminution (De Carvalho et al. 2017).

Il semble que l'apport en taurine par l'alimentation chez les chiens traîneau soit abondant, cependant des études ultérieures seraient intéressantes afin d'étudier l'intérêt éventuel d'une supplémentation en taurine chez ces chiens.

### *4. Le sélénium*

Le sélénium est un oligoélément antioxydant, du fait de son rôle de cofacteur enzymatique pour les enzymes GPX et la Trx réductase à activité antioxydante.

Le sélénium est présent en quantité importante dans la viande, le poisson, les produits laitiers et les céréales, ainsi que dans la nourriture sèche industrielle donnée aux chiens de traîneau qui est le plus souvent complétementée (Taleux 2019). Ainsi il semble a priori que la nourriture du chien de traîneau apporte du Se par la nourriture sèche mais également via les produits carnés.

Nous avons vu que chez le rat, une déficience en Se était à l'origine d'une augmentation de la peroxydation lipidique dans le muscle lors d'un exercice (Sen, Goldfarb 2000). Il a également été mis en évidence chez des athlètes humains que l'exercice entraînait une diminution progressive du taux plasmatique et urinaire en Se (Maynar et al. 2019) et que les athlètes déficitaires avaient des marqueurs de stress oxydatif augmentés par rapport aux athlètes non déficitaires. Le Se permet donc de lutter contre le stress oxydatif généré par l'effort, en augmentant notamment l'activité de la GPX (Heffernan et al. 2019).

Cependant, l'action antioxydante du Se est dose dépendante. En effet un apport inadapté et trop élevé en Se aurait plutôt une action pro-oxydante (Heffernan et al. 2019).

Il serait donc intéressant d'étudier un éventuel déficit en Se chez le chien de traîneau, et consécutivement l'utilité d'une supplémentation en Se dans la lutte contre le stress oxydatif lié à l'effort de course.

## 5. *L'ubiquinone*

L'ubiquinone, aussi nommé coenzyme Q10, est un transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, et également un puissant antioxydant capable de stopper les chaînes de peroxydation lipidiques, de protéger les lipides, les protéines et l'ADN de l'oxydation et de recycler la vitamine E (Sen, Goldfarb 2000). L'ubiquinone est présent en grandes quantités dans les tissus à forte concentration mitochondriale tels que le muscle strié squelettique (Bentinger, Tekle, Dallner 2010).

Il est à la fois endogène, synthétisé dans toutes les cellules de l'organisme, et exogène, puisque l'organisme peut l'absorber lors d'un apport alimentaire en viande, en graines et en oléagineux (Sen, Goldfarb 2000), et contrairement aux antioxydants étudiés précédemment, l'alimentation industrielle sèche n'est pas complémentée en ubiquinone.

Il a été montré chez de jeunes athlètes, qu'un effort de course sous-maximal était à l'origine d'une diminution du taux d'ubiquinone plasmatique, et cela en lien avec l'augmentation des besoins en coenzyme Q10 de certains tissus tels que les muscles squelettiques, lors de l'exercice. Des études ont montré que l'inhibition de la synthèse d'ubiquinone était à l'origine de baisse des performances sportives et d'augmentation des lésions musculaires provoquées par l'exercice. Cela montre bien que l'ubiquinone est importante dans le fonctionnement musculaire au cours de l'effort, et que du fait de la diminution de son taux plasmatique lors d'un exercice, il serait intéressant d'apporter de l'ubiquinone par l'alimentation chez le sportif. Une supplémentation en ubiquinone chez de jeunes coureurs a montré qu'elle permettait de diminuer de 50% la diminution du taux plasmatique d'ubiquinone pendant l'effort, par rapport aux athlètes non complémentés, mais cette supplémentation n'a pas permis d'augmenter les performances sportives (Orlando et al. 2018). Il a été établi chez des pompiers sportifs, que cette supplémentation diminuait significativement les taux d'isoprostanes et de 8OH-dG urinaires, ainsi que l'oxydation des LDL dans le sang.

Cela est en lien avec l'action antioxydante directe de l'ubiquinone, mais aussi avec le fait que la supplémentation en ubiquinone a permis d'augmenter significativement le taux de vitamine E plasmatique, ainsi que l'activité de la CAT et de la GPX. Ainsi la supplémentation en ubiquinone chez l'athlète humain a permis de diminuer le stress oxydatif généré par un exercice (Sarmiento et al. 2016).

Il serait donc intéressant d'étudier les variations du taux plasmatique d'ubiquinone chez le chien de traîneau lors d'un effort de course, ainsi que l'effet d'une éventuelle supplémentation orale sur les performances sportives, les lésions musculaires, et le stress oxydatif.

## *6. Les caroténoïdes*

Nous avons vu précédemment que les caroténoïdes sont des pigments végétaux présents dans les fruits et légumes. Ce sont de bons antioxydants liposolubles, qui assurent la protection des membranes lors d'un stress oxydatif, par neutralisation des ROS et arrêt des chaînes de peroxydation lipidique.

Il semble a priori que les caroténoïdes ne fassent pas partie de l'alimentation de base du chien de traîneau, puisque les mushers ne donnent pas de fruits et légumes à leurs chiens lorsque ceux-ci sont à l'entraînement ou en compétition, excepté pour ceux ayant choisi de donner une ration ménagère, ce qui représente 3% des mushers concourant l'édition 2019 de course de La Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc.

Cependant, l'action antioxydante des caroténoïdes seuls, chez l'homme ou chez le chien lors d'un exercice, n'a pas encore été étudiée. Seule l'effet antioxydant d'une supplémentation simultanée en vitamine E, caroténoïde et lutéine a été montrée chez le chien de traîneau pour le moment (Baskin et al. 2000).

Il semblerait que les propriétés antioxydantes des caroténoïdes puissent être bénéfiques dans la lutte contre le stress oxydatif lors de l'effort, mais cela reste à prouver (Zink, Van Dyke 2018).

## *7. Les polyphénols*

Nous avons vu que les polyphénols étaient de bons antioxydants exogènes, capables de diminuer l'activité d'enzymes pro-oxydantes, d'inactiver de nombreux ROS, de chélater des métaux de transition, et ils ont également une action anti-inflammatoire. Il a été montré qu'ils assuraient ainsi une protection efficace des lipides membranaires et de l'ADN face au stress oxydatif.

L'apport alimentaire en polyphénols se fait principalement par l'ingestion de fruits, de légumes, et de graines. Il a été montré chez l'homme que l'ingestion d'une petite quantité de flavonoïdes, qui représentent une sous-classe de polyphénols, permet d'augmenter significativement la capacité antioxydante plasmatique globale. Il est supposé que ce mécanisme repose sur le fait que l'ingestion de flavonoïdes entraîne une augmentation significative du taux d'acide urique plasmatique, qui est lui-même un puissant antioxydant.

Des études ont permis de mettre en évidence chez des athlètes que les polyphénols contenus dans le cacao permettaient de diminuer l'oxydation des lipides et des protéines et d'augmenter les défenses antioxydantes. Mais une telle complémentation n'a pas montré d'effet bénéfique significatif concernant l'inflammation générée par l'exercice, les performances sportives, et la récupération après la course.

Une autre étude menée sur des rats a permis de montrer que l'acide férulique, qui est le phénol le plus abondant contenu dans les végétaux, augmentait la capacité des rats à nager longtemps, diminuait le taux de peroxydation lipidique et augmentait les capacités antioxydantes enzymatiques et non-enzymatiques lors d'un exercice (You et al. 2010).

Une étude menée chez le chien de traîneau a également permis de montrer qu'une supplémentation en myrtille, riche en phénols, lors d'une course de 30 minute à 70% de la VO<sub>2</sub> max, permettait d'augmenter significativement la capacité antioxydante plasmatique totale ainsi que le taux d'acide urique plasmatique. En revanche cette supplémentation n'a pas permis de diminuer le taux de CK, ni le taux d'isoprostane plasmatiques (Dunlap, Reynolds, Duffy 2006).

Il pourrait donc paraître intéressant de compléter l'alimentation du sportif avec des polyphénols, en vue de limiter le stress oxydatif (Massaro et al. 2019). Il est tout de même important de noter que l'absorption des polyphénols peut fortement varier d'une race à l'autre, mais également d'un individu à l'autre, et que ce sont des composés fortement métabolisés.

## B. Etude des propriétés antioxydantes du *Porphyra umbilicalis*

L'algue rouge *Porphyra umbilicalis*, aussi appelée « nori », est une algue consommée dans de nombreux pays du monde, et plus particulièrement au Japon. Elle est riche en fibres, en eau, en polysaccharides qui constituent 48% du poids de matière sèche et en protéines qui représentent 49% du poids de matière sèche, mais également en vitamines. La vitamine prédominante est la vitamine C qui représente 0,2% du poids de matière sèche, mais elle contient aussi d'autres vitamines comme la vitamines B12 et la vitamine A. Pour un homme, 8g de *Porphyra umbilicalis* apporte 15% des apports nutritionnels conseillers journaliers - abrégé RNI pour Recommended Nutrient Intake - en vitamine C, 38,5% du RNI en vitamine B12 et enfin 77% du RNI en vitamine A (Santos et al. 2019).

La forte teneur en vitamine C confère donc au *P. umbilicalis* des propriétés antioxydantes.

Une étude *in vitro* réalisée par Wamine a permis de mettre en évidence, par la réalisation d'un Western Blot, une synthèse d'Hsp 70 augmentée dans des cellules de rongeurs mises en incubation avec *P.umbilicalis* puis soumises à un choc thermique, par rapport à celles incubées sans *P.umbilicalis* (PINEAU 2016).

L'augmentation de la synthèse d'Hsp 70 par le *Porphyra* confèrerait à ce dernier une autre propriété antioxydante. En effet nous avons vu que les chaperonines Hsp70 ont un fort pouvoir antioxydant cellulaire.

En revanche l'efficacité antioxydante du *Porphyra umbilicalis* n'a jamais été prouvée *in vivo*.

### C. Le glutathion et la N-acétylcystéine

Le glutathion réduit – GSH pour rappel – est un thiol non protéique à action antioxydante. Il est capable de réduire les autres thiols cellulaires ainsi que la vitamine C, et permet également l'activité antioxydante de la GPX.

La N-acétylcystéine est un acide aminé, précurseur du glutathion dans l'organisme, et une augmentation de son apport par voie orale permet d'augmenter le taux de GSH plasmatique, ce qui n'est pas le cas lors d'une supplémentation en GSH par voie orale.

Il a été montré que la N-acétylcystéine avait une action antioxydante chez le coureur seulement si celui-ci avait une déficience en GSH. Or nous avons vu que le chien de traîneau en course d'endurance pouvait être confronté à une carence en GSH. Une supplémentation orale en N-acétylcystéine pourrait donc se révéler utile pour lutter contre le stress oxydatif chez le chien de traîneau (Paschalis et al. 2018).

Les propriétés antioxydantes de la N-acétylcystéine n'ont pas été montrées chez le chien de sport. Une étude menée chez des chiens hospitalisés n'a pas permis de mettre en évidence une diminution du stress oxydatif suite à une supplémentation en N-acétylcystéine de 48h, bien que cette supplémentation ait induit une stabilisation de la concentration en GSH dans les érythrocytes (Viviano, VanderWielen 2013). Des études ultérieures seraient donc intéressantes pour montrer l'intérêt de cette complémentation chez le chien de sport.

### D. L'allopurinol

L'allopurinol est un analogue structural de l'hypoxanthine, ce qui lui donne la propriété d'être un inhibiteur de la xanthine oxydase – notée XO. Nous avons vu que la XO est une enzyme oxydante capable de générer des anions superoxydes, et il a été montré *in vivo* et *in vitro* que l'allopurinol empêchait cette production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

L'apport d'allopurinol par voie orale est possible puisque qu'elle est absorbée au niveau de l'intestin puis métabolisée en alloxanthine, qui est également un inhibiteur de la XO.

Différentes études menées sur des modèles animaux et humains, ont permis de montrer que l'allopurinol avait pour effet de prévenir l'oxydation du GSH, des protéines et des lipides lors d'un exercice intense. Par exemple, une étude menée sur des cyclistes du Tour de France, a mis en évidence qu'une supplémentation *Per os* de 300 mg par jour d'allopurinol permettait de diminuer les taux de créatinine kinase et d'aspartate aminotransférase dans le sang. Cela signifie que l'allopurinol diminue les lésions musculaires provoquées par l'exercice. La peroxydation lipidique était également moindre chez les cyclistes supplémentés, puisque le MDA plasmatique était significativement moins élevé dans le groupe traité avec l'allopurinol par rapport au groupe recevant un placebo. Une étude menée chez des marathoniens a mené à la même conclusion (Sanchis-Gomar et al. 2015). Enfin, il a été montré qu'un traitement à base d'allopurinol chez le chat permettait de diminuer les lésions de l'endothélium capillaire lors d'un phénomène d'ischémie-reperfusion (McMichael 2007).

Il est cependant supposé qu'une supplémentation à long terme serait susceptible de diminuer l'adaptation des tissus dans la lutte contre le stress oxydatif chez l'athlète. Des études supplémentaires sur le long terme seraient donc intéressantes afin d'évaluer l'intérêt d'une supplémentation en allopurinol chez l'homme et l'animal sportif, puisque cette molécule semble être un traitement prometteur dans la lutte contre le stress oxydatif engendré par l'effort (Sanchis-Gomar et al. 2015).

#### E. Un traitement prometteur : les activateurs de Nrf2

Nous avons vu que le facteur de transcription Nrf2 était un élément clé de la mise en place d'une réponse cellulaire lors d'une modification du statut redox cellulaire, en permettant l'activation de systèmes antioxydants.

Des molécules naturelles, telles que le sulforaphane – abrégé SFN -, le curcumin, la quercétine et le résveratrol, ainsi que des molécules synthétiques, sont capables d'activer le facteur de transcription Nrf2. Il a par exemple été montré que le SFN avait un effet protecteur cérébrale par activation du facteur Nrf2 lors de phénomènes d'ischémie-reperfusion cérébraux (Robledinos-Antón et al. 2019).

Des études ont également mis en évidence l'efficacité de ces molécules dans la lutte contre le stress oxydatif lors d'un exercice chez des souris. En effet une injection intrapéritonéale de SFN diminue significativement la peroxydation lipidique provoquée par l'exercice de nage, et limite la diminution du rapport GSH/GSSG par rapport au groupe non traité. La diminution des marqueurs sanguins de lésions musculaires permet également de dire que le SFN a un effet protecteur musculaire lors d'un exercice. Enfin, le traitement a également permis d'améliorer significativement les performances de nages des souris.

Des propriétés similaires ont été mises en évidence pour le curcumin (Vargas-Mendoza et al. 2019).

Bien que de nombreuses propriétés de ces molécules restent à explorer, les activateurs du facteur Nrf2 sont des molécules prometteuses dans le but de limiter le stress oxydatif provoqué par l'exercice (Robledinos-Antón et al. 2019).



## F. Importance de l'entraînement

De nombreuses études réalisées chez l'homme (Margaritelis et al. 2018), chez le rat (Hollander et al. 1999) ont permis de montrer que l'exercice régulier permettait à l'organisme de mieux lutter contre le stress oxydatif, grâce à plusieurs mécanismes d'adaptation.

Tout d'abord il a été montré que les ROS produits lors de l'exercice favorisaient l'augmentation du nombre de systèmes antioxydants, ainsi que leur activité. Chez le rat par exemple, l'entraînement favorise l'activation de la transcription des gènes de la SOD, l'augmentation de son activité, ainsi que de l'activité de la CAT et de la GPX dans le muscle (Hollander et al. 1999). Il a également été montré chez des athlètes humains que cette augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes augmentait d'autant plus lorsque la production de ROS par l'organisme était forte lors de l'entraînement. En effet, le groupe d'athlètes produisant le plus de ROS lors de l'entraînement, voit ses capacités antioxydantes - activité des enzymes antioxydantes et système glutathion - augmenter de façon significativement plus importante que le groupe qui produit le moins de ROS, et en lien avec cela, le groupe qui produit le plus de ROS, enregistre également la plus importante diminution d'isoprostane et de carbonyles protéiques entre le début de l'entraînement et la fin de l'entraînement 3 semaines plus tard. Ainsi, il a été mis en évidence que la production de ROS au cours de l'entraînement jouait un rôle crucial pour l'adaptation des systèmes antioxydants, et permettait donc paradoxalement d'aboutir à une diminution de l'oxydation des biomolécules (Margaritelis et al. 2018).

Il y a donc une adaptation de l'organisme à un stress oxydatif régulier et l'entraînement paraît donc bénéfique pour limiter les conséquences délétères de la production de ROS. Cependant, l'effort est tellement intense chez le chien de traîneau lors d'une course, que ces adaptations ne suffisent pas à conserver l'homéostasie redox cellulaire, car en effet nous avons vu que même chez des chiens entraînés, la course est à l'origine d'un stress oxydatif. C'est pourquoi il paraît important de compléter l'aliment de ces athlètes de haut niveau en antioxydants lorsqu'ils réalisent des efforts intenses. Cependant, l'utilisation d'antioxydants à l'entraînement, en effort sous-maximal, peut-être discuté du fait du caractère bénéfique des ROS dans la contraction musculaire et dans le développement des défenses antioxydantes. De nombreuses études ont d'ailleurs montré un effet délétère d'une supplémentation en antioxydants pour les performances sportives. Il serait donc intéressant d'étudier l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants chez le chien de traîneau à l'entraînement et l'impact de cette supplémentation sur les capacités antioxydantes de l'organisme (Gomez-Cabrera, Domenech, Viña 2008).

## G. Habituation à l'altitude

Nous avons vu que les chiens concourant la Grande Odyssée Savoie-Mont Blanc, courent à une altitude allant de 800 à 2000 mètres. Or nous avons vu que la haute altitude, pouvait être à l'origine d'une production accrue de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale principalement.

Des études ont également permis de montrer qu'une période d'acclimatation à haute altitude permettait à l'organisme d'augmenter ses systèmes de défense antioxydants. Par exemple, chez des hommes habitants habituellement à basse altitude, 1 semaine à 3500 mètres d'altitude, puis 3 semaines à 4500 mètres, provoquent l'augmentation du rapport GSH/GSSG sanguin, du taux de SOD, GPX, CAT et d'acide urique. Il y a donc une adaptation des systèmes antioxydants au stress oxydatif induit par la montée en altitude.

Une autre étude menée sur des cyclistes, soumis ou non à une période d'acclimatation similaire à celle décrite précédemment, a montré que les cyclistes acclimatés avaient des taux plasmatiques diminués en marqueurs de l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides, par rapport aux cyclistes non acclimatés (Quindry et al. 2016). Cela signifie que l'adaptation des systèmes antioxydants lors de la période d'acclimatation permet de diminuer les lésions oxydatives des biomolécules provoquées par l'exercice.

Il serait donc intéressant d'étudier si une période d'acclimatation est susceptible de diminuer le stress oxydatif généré par l'exercice effectué en altitude chez le chien de traîneau.

## H. Limiter le stress physique et psychologique

Le stress peut être provoqué chez le chien par un ou plusieurs stimuli intrinsèques ou extrinsèques qui obligent l'organisme à s'adapter afin de conserver son homéostasie (Yaribeygi et al. 2017). Il a été montré que l'exercice effectué par les chiens de sport, et notamment par les chiens de traîneau, était à l'origine d'un stress, qui a été mis en évidence par une augmentation des catécholamines (Peronnet et al. 1982) et du cortisol (Royer et al. 2005) lors d'une course. Or nous avons vu que ce stress était un facteur prédisposant au stress oxydatif chez le chien, à cause notamment de l'oxydation des catécholamines. Le schéma (Figure 35) suivant reprend les différentes étapes constitutives d'un stress chez le chien, depuis le stimulus, jusqu'à la réponse de l'organisme et menant à d'éventuelles conséquences pathologiques, telles que le stress oxydatif.

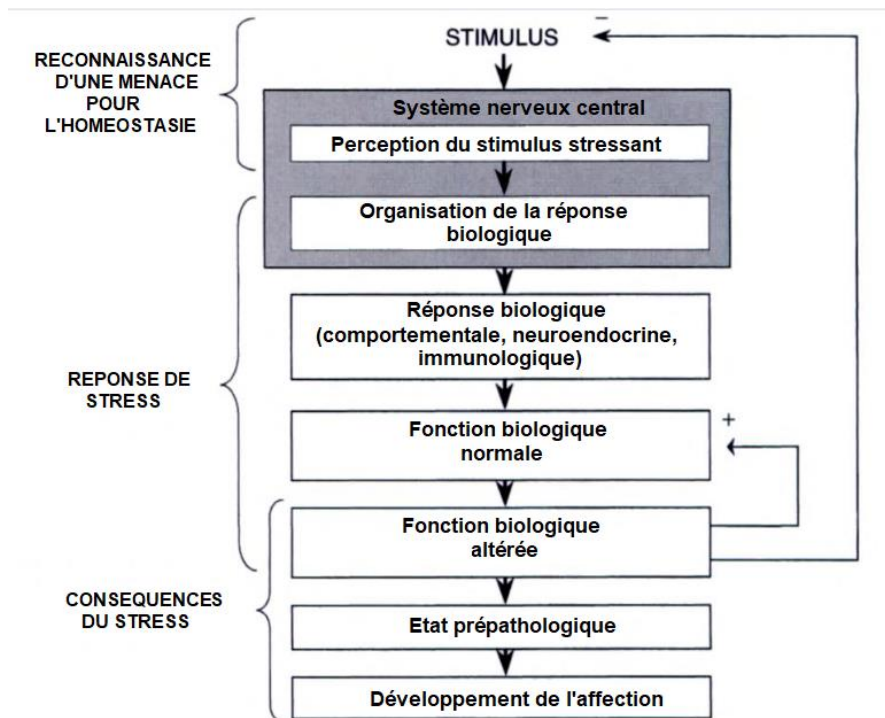


Figure 35 : Modèle du déroulement d'un stress chez le chien (Moberg 2000)

Le stress provoqué par l'exercice a plusieurs origines. Tout d'abord l'augmentation des besoins énergétique en lien avec l'exercice peut mener à un déficit énergétique, pouvant être lui-même à l'origine d'un stress métabolique. Il paraît donc essentiel d'estimer correctement les besoins nutritionnels des chiens de traîneau, afin de leur apporter une énergie suffisante et digestible (Royer et al. 2005).

Il a également été montré que des changements d'habitudes tels que des changements de couchage et de congénères peuvent provoquer un stress chez le chien (Beerda et al. 1999). Nous avons également vu dans une partie précédente, que le stress lors d'une course de chien de traîneau pouvait être lié aux multiples transports, aux attentes avant le départ, aux bruits, aux lumières, aux publics et à encore bien d'autres facteurs. Les chiens Eurohounds et Alaskan sont d'autant plus prédisposés au stress puisque ce sont des chiens avec une émotivité et une sensibilité accrue au stress.

Il est donc essentiel de limiter au maximum les changements environnementaux lors de courses, en assurant un environnement rassurant et habituel aux chiens de traîneau, et en essayant de s'approcher au maximum de leur conditions de travail habituelles. Cela étant difficile sur des courses de chien de traîneau telle que la LGO, il peut également être intéressant d'habituer les chiens à changer régulièrement leurs conditions de travail, pour diminuer le stress généré par ces modifications environnementales.

Il est aujourd'hui établi que l'exercice chez le chien de traîneau induit un stress oxydatif, impliqué dans le développement de certaines affections aiguës telles que les diarrhées ou les myopathies, ainsi que dans des affections chroniques telles que la cataracte et les processus tumoraux. Nous avons vu que l'organisme est capable d'adapter ses défenses antioxydantes afin de lutter plus efficacement contre le stress oxydatif. Mais la mise en évidence d'une augmentation de l'oxydation des molécules chez les chiens de traîneau effectuant des efforts intenses lors de courses de moyennes distances par exemple, montre que l'adaptation des systèmes antioxydants n'est pas suffisante pour conserver l'homéostasie rédox.

Ainsi il est important de favoriser une augmentation des défenses antioxydantes et de diminuer la production de ROS lors d'exercice extrême. Pour cela il est important de veiller à un apport suffisant en antioxydants, tels que la vitamine E et le sélénium, dans l'alimentation. Nous avons également vu l'importance de l'entraînement pour l'adaptation des défenses antioxydantes, et de même, l'importance de l'acclimatation à l'altitude et de la limitation du stress psychologique.

Pour résumer, les antioxydants dont on a prouvé l'efficacité chez les chiens de traîneau ou chez l'homme lors d'exercice extrême sont :

- ❖ Les vitamines E et C
- ❖ La taurine
- ❖ Le sélénium
- ❖ L'ubiquinone
- ❖ Les caroténoïdes
- ❖ Les polyphénols
- ❖ Le GSH et la NAC
- ❖ L'allopurinol
- ❖ Les activateurs de Nrf 2

Nous avons vu cependant que l'utilisation à trop fortes doses de certains antioxydants tels que la vitamine C, le sélénium ou l'allopurinol, pouvait avoir un effet pro-oxydant. Il est donc fondamental d'étudier la quantité à administrer dans le cadre d'une supplémentation en antioxydants, afin d'obtenir la concentration plasmatique permettant l'obtention d'un effet antioxydant optimal.

## **Seconde partie**

**Etude expérimentale - Utilisation d'un traitement à base de *Porphyra umbilicalis* chez des chiens de traîneau durant une course de moyenne distance : La Grande Odyssée Savoie Mont Blanc**



## I. Cadre de la mise en place de l'étude

### A. Importance du stress oxydatif chez le chien de traîneau à l'effort

Nous avons souligné dans la première partie de ce travail l'importance du stress oxydatif chez le chien de traîneau lors de courses d'entraînement ou de compétition. Nous avons vu que de nombreux facteurs entrent en jeu dans la production de ROS au cours de l'effort et il est fréquent que les défenses antioxydantes du chien de traîneau soient dépassées.

Le stress oxydatif revêt donc une importance du fait du nombre de chiens de traîneau touchés, mais également du fait de son implication dans de nombreuses affections comme les lésions intestinales et musculaires pendant l'effort, et dans certaines lésions dégénératives pouvant mener à des processus tumoraux par exemple.

Il paraît donc essentiel aujourd'hui de développer des stratégies médicamenteuses et nutritionnelles, en excluant les substances dopantes, ainsi que des stratégies d'entraînement, permettant de limiter le stress oxydatif chez les chiens de traîneau. C'est dans le cadre de cette recherche que s'inscrit cette étude des propriétés antioxydantes du *Porphyra umbilicalis*.

### B. Manque de données concernant les effets anti-oxydants du *Porphyra umbilicalis* chez le chien

De nombreuses molécules antioxydantes ont démontré leur efficacité dans la lutte contre le stress oxydatif chez l'homme et l'animal lors d'un exercice. Cependant, aucune donnée n'existe pour le moment concernant les propriétés antioxydantes du *Porphyra umbilicalis* administré par voie orale lors d'un exercice chez le chien.

Pour le moment seule l'efficacité antioxydante *in vitro* du *Porphyra umbilicalis* sur des cellules de rongeurs a pu être prouvée. En effet cette étude utilisant la technique du Western Blot, a montré que le *Porphyra* stimulait la synthèse de Hsp70 par les cellules en cas de choc thermique (PINEAU 2016).

## II. Présentation du médicament Protéostress® de Wamine

### A. Composition du Protéostress®

Le Protéostress® est composé de (Le Point Vétérinaire 2019) :

- ❖ 31% de Porphyral HSP (extrait d'algue de *Porphyra umbilicalis*)
- ❖ 30% d'huile vierge de bourrache (graine de *Borago off.*)
- ❖ Gélatine de poisson
- ❖ Glycérol

Le Porphyril HSP® est un ingrédient breveté par le laboratoire PiLeJe. Il est extrait de l'algue rouge *Porphyra umbilicalis*, dont les cellules sont capables de sécréter un grand nombre de protéines HSP70 en cas de stress environnemental thermique, infectieux et traumatique par exemple (PiLeJe 2020). Nous avons vu précédemment que le Porphyril HSP® induisait une augmentation de l'expression des protéines HSP70 dans des cellules de souris soumises à un choc thermique. L'hypothèse faite est donc que le Porphyril HSP® apporté par voie orale induirait une augmentation de la production de HSP70 par les cellules de l'organismes soumises à différents stimuli stressants.

L'huile de bourrache est obtenue par pression à froid des graines de *Borago officinalis*. Une étude a permis de montrer que cette technique permettait d'obtenir une huile composée de 83,31% d'acides gras insaturés et de 13,26% d'acides gras saturés, et dont les 3,43% d'acides gras restants n'ont pas pu être précisément identifiés dans cette étude. Les proportions des différents acides gras présents dans l'huile de bourrache sont présentées dans le Tableau VI suivant (Khattab et al. 2017) :

*Tableau VI : Composition en acide gras de l'huile de Bourrache obtenu par pression à froid des graines de Borago officinalis (Khattab et al. 2017)*

Nom commun	RT (min)	%	Nom systématique
Lauric acid	29.06	1.14	Dodecanoic acid
Palmitic acid	29.66	7.64	Hexadecanoic acid
Palmitoleic acid *	30.05	6.25	Cis-9- Hexadecanoic acid
U	30.40	1.55	
Stearic acid	30.86	3.08	Octadecanoic acid
Oleic acid *	31.08	14.23	Cis-9-Octadecanoic acid
U	31.46	0.15	
Linoleic acid *	32.68	34.23	Cis-9,12-Octadecanoic acid
$\gamma$ - Linolenic acid *	34.21	24.79	Cis-9,12,15-Octadecanoic acid
Brassicic acid *	36.28	0.06	Trans-13- Docosenoic acid
Arachidic acid	37.40	1.4	Eicosanoic acid
U	38.38	1.73	
Erucic acid *	40.46	2.06	Cis-13-docosenoic acid
Nervonic acid*	41.08	1.69	Cis-15-Tetracosenoic acid
<b>Acides gras insaturés</b>		<b>83.31 % of total fatty acids</b>	
<b>Acides gras saturés</b>		<b>13.26 % of total fatty acids</b>	

\*: Acides gras insaturés

U: Acides gras non identifiables

RT : temps de rétention (méthodes GC-MS)

Parmi les acides gras insaturés, on retrouve dans l'huile de bourrache 24,79% d'acide  $\gamma$ -linoléiques. Or ces acides sont impliqués dans la composition des membranes plasmiques, mais également dans la synthèse de certaines eicosanoïdes telles que la prostaglandine E1. Ces eicosanoïdes possèdent des rôles physiologiques majeurs qui découlent notamment de leur chaîne hydrophobe. Les eicosanoïdes sont présentes dans tous les tissus de l'organisme, dans lesquels elles jouent des rôles de régulation de l'activité cellulaire, et permettent par exemple de moduler la contraction des fibres musculaires lisses, l'agrégation plaquettaire et les sécrétions gastriques. Elles sont en ce sens considérées comme des hormones. Plus spécifiquement, les eicosanoïdes produits lors du métabolisme des acides linoléiques ont une action anti-inflammatoire, et contribuerait donc à diminuer le stress oxydatif. Elles



sont également essentielles dans la fluidité des membranes et des graisses dans l'organisme. En effet, la composition en lipides membranaires est dépendante des apports alimentaires en acides gras polyinsaturés (Khattab et al. 2017). Ainsi il a été montré que l'acide linoléique permettait une amélioration de la qualité de la barrière cutanée, et permettait notamment une diminution des symptômes en lien avec une atopie chez l'Homme (Tasset-Cuevas et al. 2013).

Les excipients utilisés sont la gélatine de poisson, qui est le résultat d'un traitement des arrêtes et de la peau de poisson, visant à extraire puis hydrolyser le collagène. Il est utilisé pour donner sa texture au médicament. Le glycérol est quant à lui est un alcool composé de 3 atomes de carbones liés chacun à un groupement alcool. C'est un liquide incolore, visqueux et inodore au goût sucré, fréquemment utilisé dans la composition de gélules.

## B. Résumé des caractéristiques du produit

### 1. Indications recommandées par Wamine®

Le laboratoire Wamine® recommande l'utilisation de l'aliment complémentaire Protéostress® lors des situations amenant à un stress oxydatif cellulaire que nous avons précédemment détaillées dans la partie bibliographique (Wamine 2020).

### 2. Posologie recommandée

Des études internes ont permis de montrer que les doses optimales et sans effets secondaires administrables aux chiens étaient les suivantes (Tableau VII) :

*Tableau VII : Posologies de Protéostress® recommandées par le laboratoire Wamine® (Wamine 2020)*

<b>Poids</b>	<b>Posologie</b>
<b>Jusqu'à 15 kg</b>	1 capsule par jour
<b>Jusqu'à 30 kg</b>	2 capsules par jour
<b>Au-delà de 30 kg</b>	3 capsules par jour

Aucun effet secondaire n'a été rapporté sur les chiens utilisés lors de ces études.

### III. Protocole d'étude du médicament Protéostress®

#### A. Objectif

Cette étude a été menée afin de tester l'efficacité du *Porphyra umbilicalis* pour lutter contre le stress oxydatif chez les chiens de traîneau en courses de moyennes distances. Pour cela, nous avons voulu nous intéresser à l'intensité des diarrhées des chiens de traîneau supplémentés et non supplémentés en *P. umbilicalis*, tout au long des 10 jours de courses. L'étude de la numération-formule sanguine et de certains paramètres biochimiques avant et après 8 jours de course a permis également d'évaluer l'incidence de la supplémentation en *Porphyra umbilicalis* sur ces paramètres biochimiques en lien avec le stress oxydatif.

Nous détaillerons plus précisément le protocole d'étude dans la partie suivante.

#### B. Matériels et méthodes

##### *1. Sélection des chiens de l'étude et échantillonnage*

L'échantillonnage est un préalable à toute étude statistique, et consiste à sélectionner un sous-ensemble d'individus à l'intérieur d'une population.

Pour sélectionner les chiens de l'étude, nous avons envoyé un mail à tous les mushers participant à l'édition 2020 de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc, en leur expliquant notre étude ainsi que le protocole. Ils ont ainsi pu choisir de façon éclairée leur participation ou non à cette étude.

Parmi les 21 mushers participants, 7 ont répondu favorablement et se sont montrés intéressés par le sujet de l'étude.

Concernant les chiens de ces 7 mushers, nous avons défini comme seul critère de non-inclusion le fait de ne pas courir. Ainsi, si avant la course il est prévu qu'un chien ne courre pas du tout pendant la course, celui-ci est retiré de l'étude. De même nous avons défini comme seul critère d'exclusion le fait qu'un chien arrête de courir définitivement, c'est-à-dire lorsque celui-ci est « droppé » par l'équipe vétérinaire en lien avec une blessure, une fatigue trop importante ou une maladie. Parmi les 7 mushers ayant répondu favorablement à notre demande, 2 mushers donnaient déjà le Protéostress® sous forme de cures à tous leurs chiens. Ces 2 traîneaux n'ont donc pas été inclus dans l'étude statistique que nous détaillerons dans la suite de notre travail, puisque tous leurs chiens recevaient le Protéostress® pendant toute la durée de la course.

Un autre traîneau n'a pas été inclus dans l'étude suite à un souhait d'abandon de l'étude de la part du musher le 8<sup>ème</sup> jour de la course.

Parmi les 4 traîneaux nous avons défini 3 groupes de chiens :

- Un groupe verum, qui reçoit le Protéostress durant toute la durée de la course
- Un groupe placebo, qui reçoit un médicament de formule identique au Protéostress, mais sans le P. umbilicalis, durant toute la durée de la course
- Un groupe négatif, qui ne reçoit aucun médicament de l'étude pendant la course

La comparaison des valeurs du groupe négatif et du groupe placebo nous permettra également d'évaluer l'efficacité antioxydante des autres composants du Protéostress®.

D'un traîneau à l'autre, les conditions de vie et de course, ainsi que les races des chiens peuvent différer, et ces différences peuvent influencer le stress oxydatif des chiens pendant la course, c'est ce biais qu'on appelle « l'effet traîneau ». Ainsi nous avons choisi de tirer au sort les chiens des 3 groupes dans chaque traîneau, en fixant préalablement la proportion de chiens appartenant à chacun des groupes. Ce qui permet d'avoir les mêmes proportions des 3 groupes dans chaque traîneau (Tableau VIII) :

*Tableau VIII : Proportions des 3 groupes de chiens : Verrum, Placebo et négatif, dans les 4 attelages de l'étude (Peytoureau F., 2020)*

<b>Grégory COFFRE</b>	<b>Jérôme SERRES</b>	<b>Tommy CERF</b>	<b>Cindy DUPORT</b>
M'ALFA	KAYACK	HULK	NOISETTE
JEEPSY	KIRUNA	THOR	NOUKY
M'ODYSSEE	JOY	BRAVEHEART	JUPITER
M'EDELWEISS	SVEN	YK'S	MANUREVA
M'IGLOO	OPIUM	TRISS	NOVA
M'SCRAPPY	OTCHOUM	ARROW	ROMEO
M'LEADER	MAURA	TOSTAKY	SPIKE
M'YUKON	LINOUK	BLACK	NEPTUNE
	LAIKA		PEPSI
	NAIKAN		THOR
	O'MALEY		LEADER
	MOON		

Proportion Protéo + :	Proportion Protéo + :	Proportion Protéo + :	Proportion Protéo + :
0,38	0,42	0,38	0,36
Proportion Placebo :	Proportion Placebo :	Proportion Placebo :	Proportion Placebo :
0,38	0,33	0,38	0,36
Proportion négatif :	Proportion négatif :	Proportion négatif :	Proportion négatif :
0,25	0,25	0,25	0,27

Pour le tirage au sort aléatoire des chiens dans chaque traîneau, nous avons utilisé le logiciel Excel® et la fonction Alea().

## 2. Caractéristiques des chiens sélectionnés pour l'étude

Nous n'avons pas défini de caractéristiques d'inclusion concernant les chiens de l'étude. En revanche il est important de vérifier l'homogénéité de nos groupes concernant les paramètres susceptibles d'influencer l'intensité du stress oxydatif en lien avec l'effort. Les paramètres que nous avons testés sont :

- ❖ L'âge
- ❖ Le sexe
- ❖ La distance parcourue pendant la course
- ❖ Le stress oxydatif avant la course
- ❖ Les diarrhées avant la course

Etant donné le faible nombre d'individus dans chacun de nos 3 groupes (inférieur à 30), il est possible d'utiliser le test non paramétrique associé à l'ANOVA 1, c'est-à-dire le test de comparaison des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon, afin de vérifier l'homogénéité des âges, des sexes, des distances parcourues, des paramètres biochimiques et de certaines affections, des trois groupes de chiens. Ce test est réalisé à l'aide du logiciel R® (R Core Team 2019).

La réalisation de ces tests pour les paramètres cités précédemment a montré des *p-value* toujours supérieures à 0,05. Cela signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des âges, des sexes (codés par « 1 » et « 2 » pour les sexes femelle et mâle respectivement) et des distances parcourues, des CK, ALAT, ASAT, Lactates, CRP entre chaque groupe. Aucun chien de l'étude ne présentait de diarrhée avant la course.

Nous avons ainsi montré que l'échantillonnage a permis de sélectionner des groupes de chiens homogènes pour les paramètres étudiés ici.

## 3. Consentement éclairé

Le consentement éclairé permet de présenter l'étude aux mushers, et d'obtenir leur accord éclairé de participation. Celui-ci permet de présenter succinctement les objectifs de l'étude, ainsi que le protocole d'étude. Ce consentement a été envoyé préalablement par mail avant la course aux mushers, et a également été distribué aux mushers le premier jour de la course, le samedi 11 janvier 2020, afin qu'ils puissent conserver sous forme papier le protocole écrit, avec les posologies détaillées, ainsi que le déroulement des journées lors desquelles sont réalisées les prises de sang (Annexe 1). Nous avons également distribué un second exemplaire que les mushers ont signé et que nous avons conservé.

#### 4. Protocole d'étude

##### i. Administration per os des gélules de Protéostress et de placebo

Les gélules de Protéostress ont été données par les mushers au nombre de 4 par jour, soit 2 le matin 6 heures avant le début de l'épreuve quand cela était possible, et 2 gélules le soir, tout au long de la course. Le traitement a été initié le 1<sup>er</sup> jour de la course, le soir du samedi 11 janvier, et s'est poursuivi jusqu'au dernier jour de la course, le mercredi 22 janvier au soir.

Des boîtes ont été distribuées aux mushers le premier jour de la course. Chaque chien avait une boîte de gélules qui lui était attribuée. Les boîtes étaient identiques entre elles, hormis le nom du chien écrit dessus. En revanche, le laboratoire Wamine® ne pouvait techniquement pas produire de gélules de Protéostress® et de placebo de la même couleur. Nous n'avons pas dit aux mushers quelles gélules étaient des gélules de Protéostress et quelles gélules étaient les gélules placebo, mais une différence entre les 2 groupes de chiens pouvait être déterminée visuellement.

##### ii. Réalisation des prises de sang à J1 et J9 de la course

Les prises de sang ont été réalisées avant la course, le samedi 11 janvier, et au 9<sup>ème</sup> jour de course, le dimanche 19 janvier. Nous avons réalisé les prises de sang le 9<sup>ème</sup> jour de course et non le dernier jour pour des raisons de praticité. En effet le dimanche 19 janvier une équipe du laboratoire Wamine® était sur place et était susceptible de m'aider dans la réalisation des prises de sang. De plus d'après notre expérience lors de l'édition 2019, il est difficile de réaliser les prises de sang le dernier jour, soit le mercredi 22 janvier, puisque les mushers quittent rapidement le village étape après la course afin de rentrer chez eux.

Le samedi 11 janvier, les prises de sang ont été réalisées dans l'après-midi entre 14h et 19h, lorsque les mushers étaient installés au village étape de Samoëns. Le dimanche 19 janvier, les prises de sang devaient être effectuées avant la course pour les chiens qui ne couraient pas l'étape du jour, et après la course pour les autres. Du fait de l'indisponibilité des mushers le matin, toutes les prises de sang ont été réalisées pour tous les chiens après la course entre 17h et 20h.

Avec l'aide d'Emma Lecostey, une étudiante en 4<sup>ème</sup> année à Vetagro-sup appartenant à l'équipe vétérinaire de l'édition 2020 de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc, j'ai pu réaliser la majorité des prises de sang. J'ai également pu bénéficier de l'aide de l'équipe vétérinaire pour les autres prises de sang. Afin d'assurer la répétabilité de cette étude, j'ai rédigé un protocole de prise de sang (Annexe 2) qui était imprimé et donné à chaque opérateur le 11 et le 19 janvier.

Je pensais pouvoir réaliser les prises de sang au niveau de la veine jugulaire afin de ne pas risquer de léser les veines céphaliques des membres antérieurs, mais cela a été difficile en pratique, puisque sans tonte nous ne sommes pas parvenus à prélever du sang dans cette zone. Ainsi nous avons décidé le jour même de réaliser toutes les prises de sang au niveau des veines céphaliques droites ou gauches des chiens de l'étude, sans tonte et avec un accord oral préalable des mushers.

De même il était prévu de réaliser les prélèvements à l'aide de vacutainers, ce qui est difficile à réaliser à la veine céphalique puisque le débit de sang est trop faible, et le remplissage des tubes trop long pour que le chien ne bouge pas pendant le prélèvement. Nous avons ainsi décidé sur place d'utiliser des aiguilles de 22 gauges (aiguilles bleues) montées sur des seringues de 5 mL.

Les examens biochimiques que nous détaillerons par la suite ont été réalisés sur le plasma des tubes héparinés, et les numérations formules sanguines ont été réalisées sur le sang des tubes EDTA.

Immédiatement après le remplissage des tubes, les 2 tubes ont été remués 5 fois lentement pour assurer un bon mélange du sang avec les adjuvants présents dans les tubes.

Les tubes, préalablement identifiés avec le nom de chaque chien, sont immédiatement placés au froid dans une glacière avec des blocs de glace.

Les échantillons ont ensuite été transférés dans un frigo à 5°C le soir du 11 et du 19 janvier jusqu'à leur analyse.

Les analyses de lactatémie devaient être réalisées immédiatement après la prise de sang de chaque chien à partir du sang mis dans les tubes héparinés, mais cela fut impossible du fait de la température extérieure trop basse qui ne permettait pas le fonctionnement des lecteurs de lactatémie Accutrend Plus®. Nous avons donc décidé de réaliser ces analyses dans un lieu à température ambiante après la réalisation des prises de sang de tous les chiens d'un même attelage. Cela a eu pour conséquence que les dosages des lactates ont été réalisés 10 à 30 minutes après les prises de sang. Cependant il a été montré qu'il n'y avait pas de modifications du taux de lactates entre T0 et T+30 min sur des échantillons de sang total conservé dans un milieu froid d'environ 0°C (Seymour et al. 2011).

En parallèle, un suivi des affections intestinales a été réalisé.

### iii. Suivi des diarrhées J1 et J9

Nous avons vu que le stress oxydatif pouvait être un facteur aggravant des diarrhées liées à l'effort chez le chien. Nous voulions donc savoir si le *Porphyra umbilicalis* permettait de réduire l'incidence de ces affections chez les chiens de traîneau en course de moyenne distance.

Pour effectuer un suivi des diarrhées des chiens de notre étude, chaque jour de la course (du samedi 11 janvier au lundi 20 janvier) Emma Lecostey est allée voir les 4 mushers de l'étude afin de savoir s'ils avaient noté d'éventuelles diarrhées ou vomissements pendant ou après la course, ce qui a permis un suivi des troubles gastro-intestinaux des chiens de nos 3 groupes.

Ces données nous permettront par la suite de comparer statistiquement l'incidence des diarrhées des 3 groupes de chiens.

### 5. Analyses des échantillons : biochimie et numération formule sanguine

Le 11 et le 19 janvier 2020, les échantillons de sang ont été conservés environ 24h au réfrigérateur à 5°C avant d'être analysés.

Or il a été montré que les taux de lactates, CRP, CK, ALAT, ASAT, PAL, Glucose, PT, Alb, ainsi que les paramètres du ionogrammes et de la numération-formule-sanguine, étaient stables dans des tubes héparinés et EDTA pendant 24 heures à 4°C (Odozo, Lombard, Portugal 2012).

Les analyses réalisées sont une numération formule sanguine donnant accès aux valeurs des paramètres suivants : Hématocrite (%), Hémoglobine (g/dL), Plaquettes ( $10^3/\text{mm}^3$ ), Globules rouges ( $10^3/\text{mm}^3$ ), Leucocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ ), Lymphocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ ), Monocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ ), Granulocytes ( $10^3/\text{mm}^3$ ) et Polynucléaires éosinophiles ( $10^3/\text{mm}^3$ ).

Une biochimie et un ionogramme ont également été réalisés, mesurant respectivement les paramètres suivants (Tableau IX) :

Tableau IX : Paramètres biochimiques dosés lors de la LGO 2020 (Peytoureau F., 2020)

Paramètre	Abréviation	Unités	Valeurs usuelles
Lactate	Lact	mmol/L	0-2,5
Proéine C réactive	CRP	mg/L	0-10
Créatinine kinase	CK	UI/L	13-119
Alanine aminotransférase	ALAT	UI/L	0-57
Aspartate aminotransférase	ASAT	U/L	0-48
Phosphatase alcaline	PAL	U/L	20-270
Glucose	Glu	g/L	0,6-1,2
Protéines totales	PT	g/L	55-80
Albumine	Alb	g/L	26-40
Chlore	Cl	mmol/L	109-122
Potassium	K	mmol/L	3,5-5,8
Sodium	Na	mmol/L	144-160

Les analyseurs utilisées le 12 et le 20 janvier 2020 sont les analyseurs de la marque Melet Scholesing®, le modèle 4S® a été utilisé pour réaliser la numération formule sanguine, et le modèle SCAN II® a été utilisé pour réaliser la biochimie sanguine. Les CRP ont elles été dosées avec le Cubevet Solo® du laboratoire Scil®, et les lactates avec les lecteurs Accutrend Plus® de la marque Cobas®.

Nous avons vu que seuls les paramètres biochimiques CK, ALAT, ASAT et CRP sont susceptibles d'être modifiés par le stress oxydatif. Dans la partie suivante de présentation des résultats de l'étude, nous allons donc comparer les paramètres CK, ALAT, ASAT et CRP entre les 3 groupes de chiens de traîneau, et nous présenterons également l'étude statistique visant à comparer l'incidence des diarrhées parmi nos 3 groupes.

#### IV. Présentation des résultats de l'étude et étude statistique

Cette partie va nous permettre de présenter les résultats de l'étude transversale, et comparer ainsi les résultats des analyses biochimiques réalisées le 8<sup>ème</sup> jour de la course ainsi que l'incidence des diarrhées chez nos 3 groupes de chiens.

Pour effectuer cette comparaison, nous avons également utilisé le test de comparaison des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon.

##### A. Comparaison des CK

Les CK sont parfaitement corrélées aux lésions des muscles squelettiques et du myocarde. C'est pourquoi nous comparerons dans cette partie les CK de nos 3 groupes de chiens afin de voir si la complémentation en *Porphyra umbilicalis* a permis de protéger le tissu musculaire des lésions liées à l'effort extrême, chez les chiens de traîneau lors de la course de moyenne distance de la Grande Odyssée Savoie Mont-Blanc.

Il est important de noter que le taux plasmatique de CK peut être augmentée physiologiquement chez le jeune, qui peut être 60% plus élevé chez un chien d'âge compris entre 6 mois et 1 an. Comme nous avons pris soin de vérifier statistiquement l'homogénéité en âge de nos 3 groupes, cette augmentation physiologique ne représente pas un problème pour la comparaison de nos résultats.

Etant donné que le pic plasmatique des CK a lieu 3 à 7h après la course et que leur clairance plasmatique est de 2h, il nous a semblé pertinent de comparer les CK des chiens ayant couru le jour des prises de sang, soit le dimanche 19 janvier.

Enfin, la créatinine kinase et les ALAT étant des paramètres sensibles à l'hémolyse, les paramètres des tubes hémolysés n'ont pas été étudiés.

Les valeurs des CK plasmatiques obtenues chez les 22 chiens ayant couru le dimanche 19 janvier, sont représentées dans le graphique ci-dessous (Figure 36) :



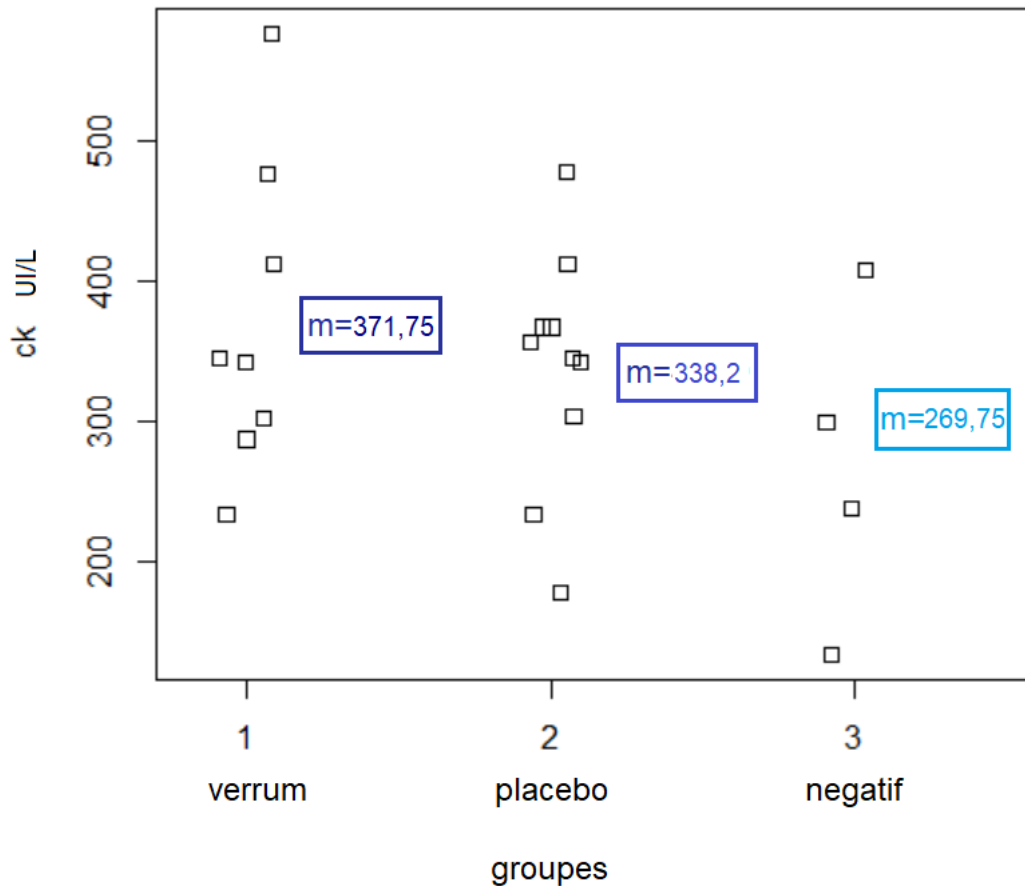


Figure 36 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des CK en UI/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des CK de chaque groupe (Peytoureau F., 2020)

Les résultats ne correspondent pas à ce que nous pouvions attendre, puisque la moyenne des valeurs de CK du groupe Verrum est supérieure à celle des groupes Placebo et Négatif.

La réalisation du test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec le logiciel R nous montre que ces différences observées entre les 3 groupes ne sont pas significativement différentes, puisqu'en effet on obtient les résultats suivants :

- Une p-value de 0,96 (>0,05) lors de la comparaison des CK des groupes Verrum et Placebo
- Une p-value de 0,21 (>0,05) lors de la comparaison des CK des groupes Verrum et Négatif
- Une p-value de 0,29 (>0,05) lors de la comparaison des CK des groupes Placebo et Négatif

Nous avons également analysé les valeurs de CK obtenues pour l'ensemble des chiens, en incluant ceux n'ayant pas couru le 19 janvier, pour lesquels nous avons obtenus des résultats similaires.

D'après les analyses des CK, le Protéostress® et le Porphyra umbilicalis n'ont donc pas permis de diminuer significativement les lésions musculaires lors de l'étape du 19 janvier de la LGO 2020.

## B. Comparaison des ASAT

L'augmentation de l'activité plasmatique des ASAT est liée à des lésions de nécrose ou d'inflammation hépatique ou musculaire, qui nous l'avons vu, peuvent être induites par exercice très extrême de course chez l'homme.

Le temps de demi-vie des ASAT étant de 5h chez le chien, il nous a semblé pertinent, de même que pour les CK, de comparer les ASAT des chiens ayant couru le jour des prises de sang, c'est-à-dire le dimanche 19 janvier.

Les valeurs des ASAT plasmatiques obtenues chez les 22 chiens ayant couru le dimanche 19 janvier, sont représentées dans le graphique ci-dessous (Figure 37) :

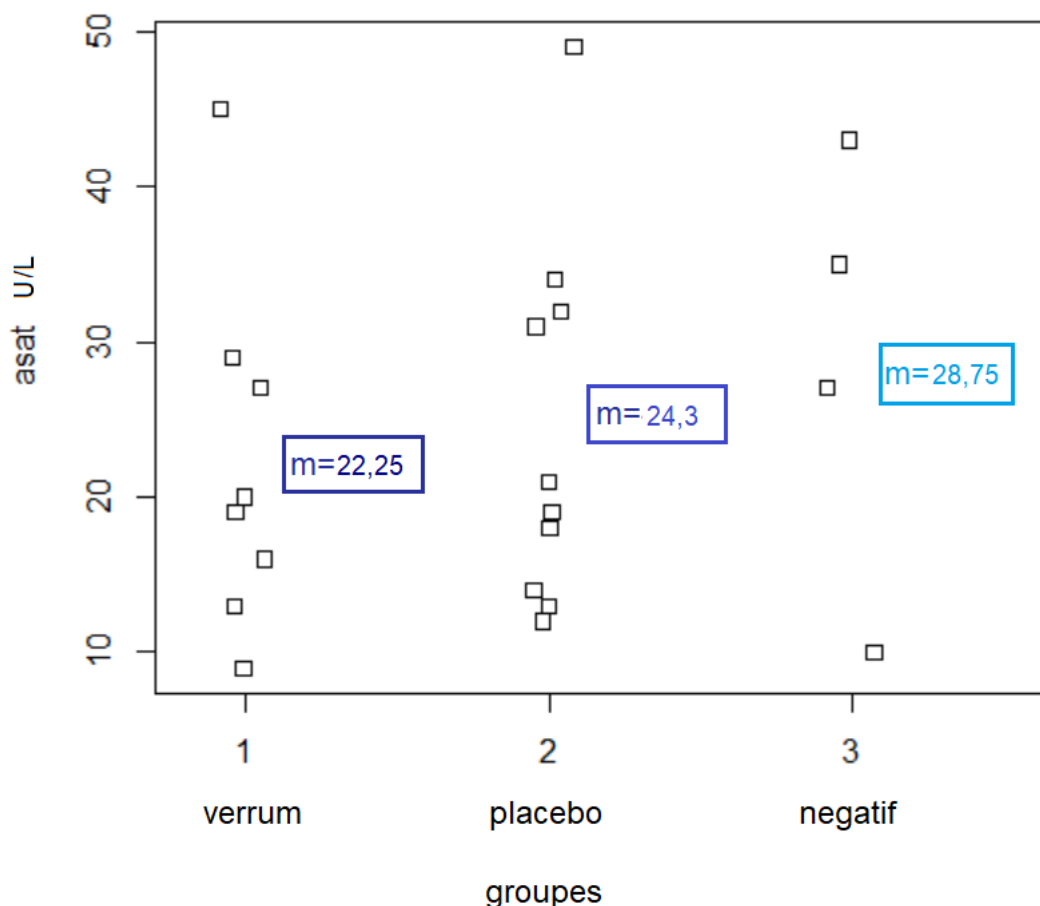


Figure 37 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des ASAT en U/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des ASAT de chaque groupe (Peytoureau F., 2020)

L'activité plasmatique des ASAT semble donc diminuée chez les chiens du groupe Verrum par rapport aux chiens des groupes Placebo et également chez les chiens du groupe Placebo par rapport aux chiens du groupe Négatif. Il semble donc que le *Porphyra umbilicalis*, ainsi que l'huile de bourrache, diminuent les lésions hépatiques et musculaires.

En revanche cela reste une tendance puisque la réalisation du test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec le logiciel R ne nous montre pas de différences significatives entre les ASAT de nos 3 groupes de chiens. Les résultats obtenus sont :

- Une p-value de 0,69 ( $>0,05$ ) lors de la comparaison des ASAT des groupes Verrum et Placebo
- Une p-value de 0,50 ( $>0,05$ ) lors de la comparaison des ASAT des groupes Verrum et Négatif
- Une p-value de 0,64 ( $>0,05$ ) lors de la comparaison des ASAT des groupes Placebo et Négatif

Nous avons également analysé les valeurs d'ASAT obtenues pour l'ensemble des chiens, en incluant ceux n'ayant pas couru le 19 janvier, pour lesquels nous avons obtenus des résultats similaires.

### C. Comparaison des ALAT

L'augmentation de l'activité plasmatique des ALAT peut être la conséquence de lésions hépatocellulaires, lors notamment d'augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes.

Nous avons précédemment supposé que ces lésions hépatiques puissent être provoquées par une attaque radicalaire des membranes hépatocytaires en lien avec le stress oxydatif généré par l'exercice.

L'activité plasmatique des ALAT varie précocement lors de lésions hépatiques, mais sa clairance est en revanche lente, et leur temps de demi-vie plasmatique est de 2,5 jours. Dans cette étude nous avons donc comparé le taux d'ALAT plasmatiques de tous les chiens appartenant aux 3 groupes. C'est-à-dire que contrairement à notre étude des taux d'ASAT et de CK, nous avons ici comparé les taux d'ALAT des chiens ayant couru, ou non, le dimanche 19 janvier.

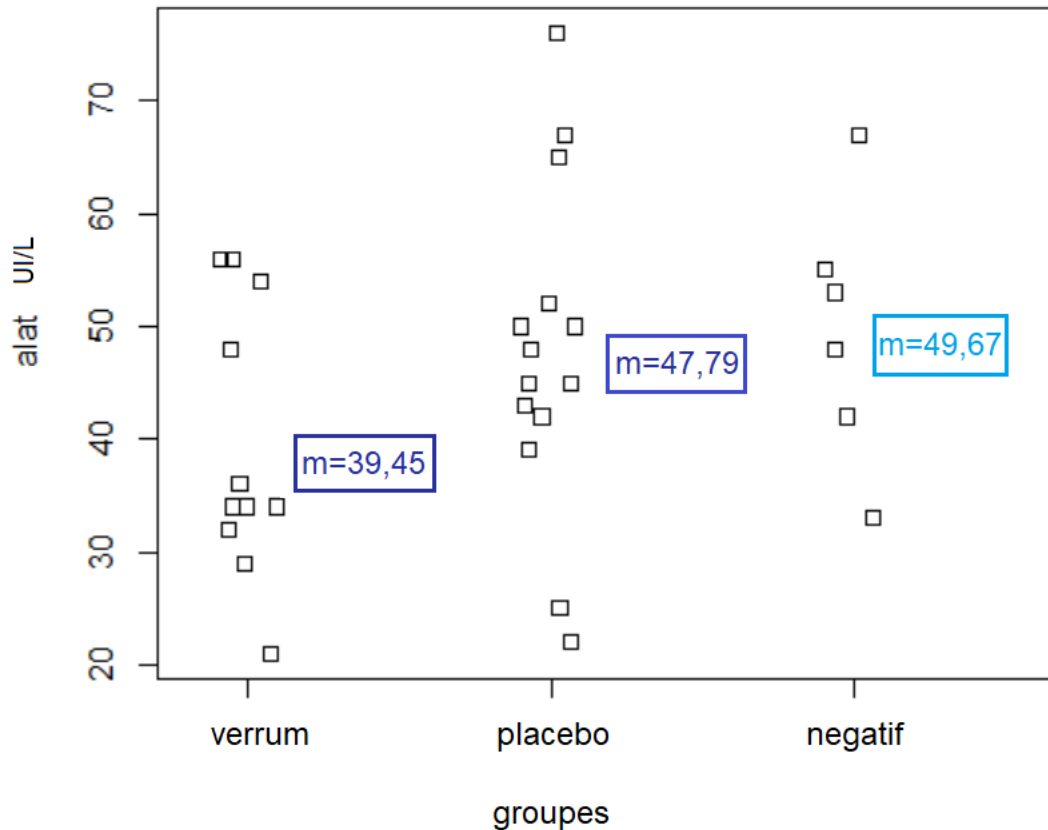


Figure 38 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des ALAT en UI/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des ALAT de chaque groupe (Peytoureau F., 2020)

L'activité plasmatique des ALAT semble donc diminuée chez les chiens du groupe Verrum par rapport aux chiens du groupe Placebo, et également chez les chiens du groupe Placebo par rapport aux chiens du groupe Négatif. Il semble donc que le *Porphyra umbilicalis*, ainsi que l'huile de bourrache, diminuent les lésions hépatocellulaires.

En revanche cela reste une tendance puisque la réalisation du test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec le logiciel R® ne nous montre pas de différences significatives entre les ALAT de nos 3 groupes de chiens. Les résultats obtenus sont :

- Une p-value de 0,19 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Verrum et Placebo
- Une p-value de 0,22 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Verrum et Négatif
- Une p-value de 0,68 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Placebo et Négatif

#### D. Comparaison des CRP

Les CRP sont des protéines qui apparaissent précocement lors d'une inflammation, chez le chien et chez l'homme. Une inflammation non liée à un processus septique, comme lors d'un exercice, provoque une augmentation modérée des CRP sanguines.

Il a été montré chez l'homme qu'une augmentation du taux de CRP sanguin au cours de l'exercice était significativement corrélée au stress oxydatif généré par l'effort (Cottone et al. 2006).

La teneur en CRP plasmatique est maximale 24h après le début du phénomène inflammatoire, et le retour à la valeur initiale se fait environ 5 jours après la fin du phénomène inflammatoire.

Dans cette étude nous avons donc comparé le taux de CRP plasmatiques de la totalité des chiens de nos 3 groupes, c'est-à-dire que nous avons comparé les taux de CRP plasmatiques des chiens ayant couru, ou non, le dimanche 19 janvier :

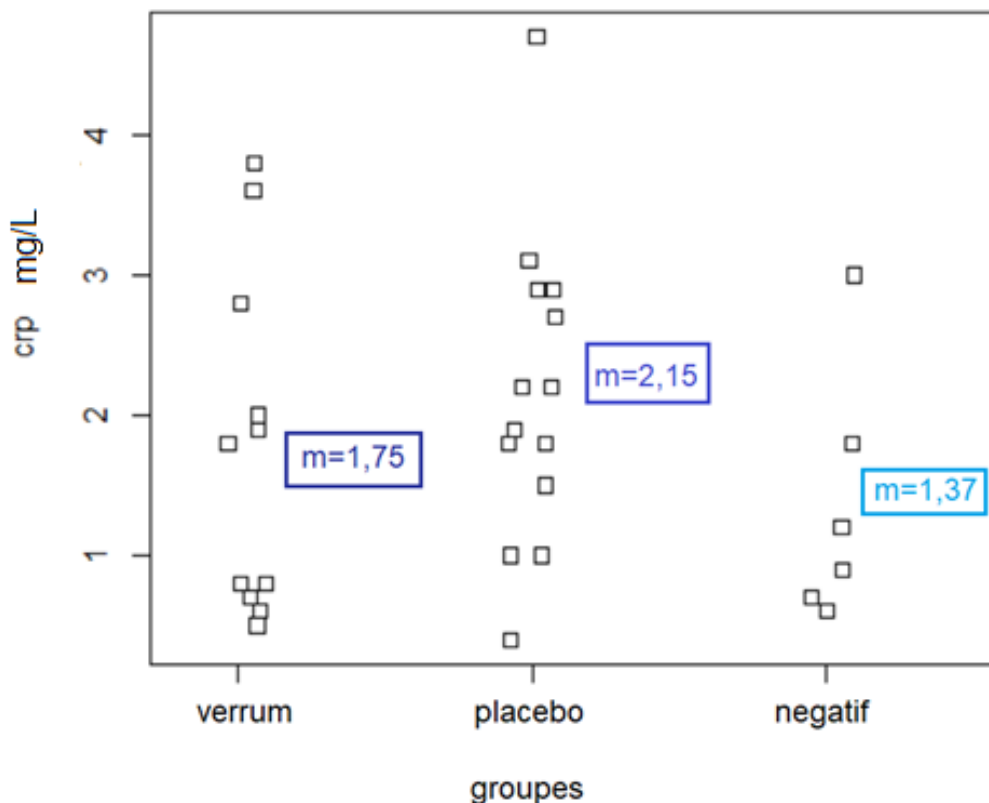


Figure 39 : Graphique en nuage de points, représentant les valeurs des CRP en mg/L obtenues pour les chiens des groupes Verrum, Placebo et Protéostress, ainsi que les moyennes des CRP de chaque groupe (Peytoureau F., 2020)

Le taux de CRP plasmatiques semble donc diminué chez les chiens du groupe Verrum par rapport aux chiens du groupe Placebo. En revanche ce taux semble augmenté chez les chiens des groupes Verrum et Placebo par rapport au groupe Négatif.

Ces différences entre les CRP plasmatiques de nos 3 groupes de chiens ne sont pas significatives d'après l'étude statistique réalisée avec le test de Mann-Whitney-Wilcoxon avec le logiciel R®. En effet les résultats obtenus sont les suivants :

- Une p-value de 0,35 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Verrum et Placebo
- Une p-value de 0,69 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Verrum et Négatif
- Une p-value de 0,13 (>0,05) lors de la comparaison des ALAT des groupes Placebo et Négatif

### E. Comparaison de l'incidence des diarrhées

D'après notre étude bibliographique, il semblerait que les lésions oxydatives des tissus intestinaux lors de phénomènes d'ischémie-reperfusion pourraient être un facteur aggravant des diarrhées d'effort. Nous avons donc suivi les diarrhées des chiens des quatre attelages participant à l'étude, durant les 9 étapes entre le dimanche 12 janvier et le lundi 20 janvier 2020, et représentées dans le graphique suivant (Figure 40) :

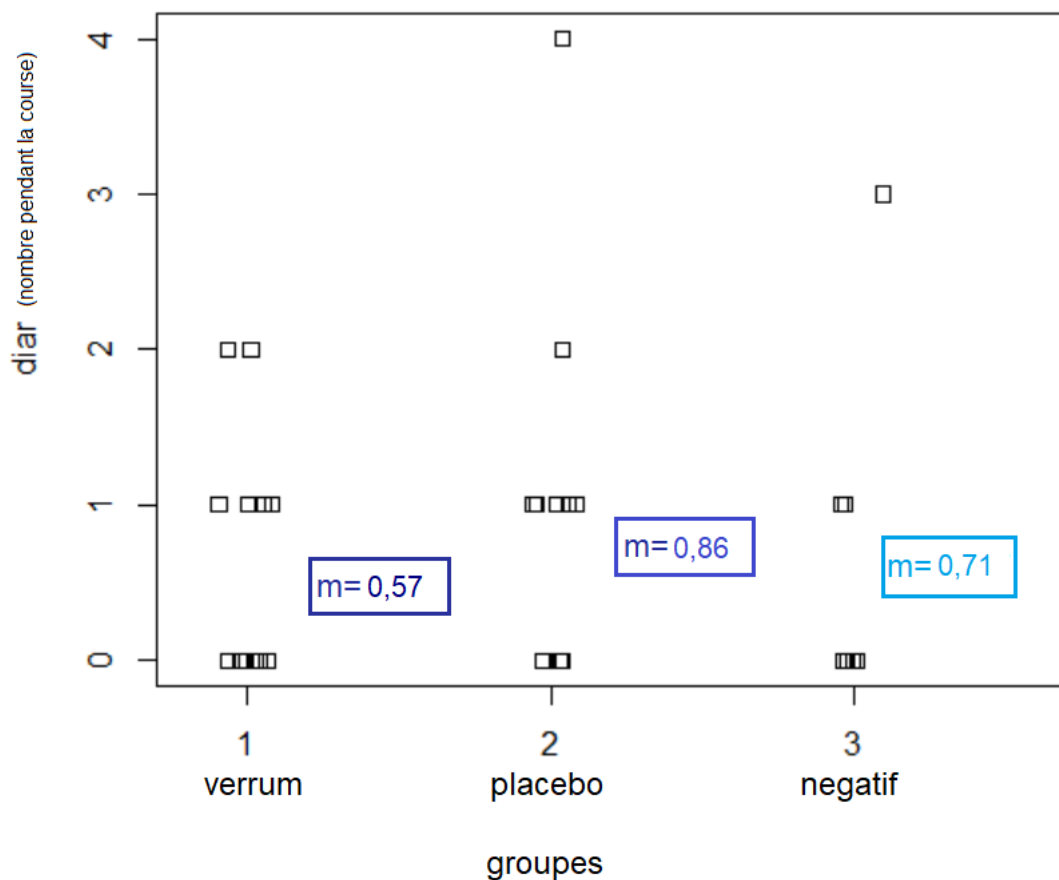


Figure 40 : Graphique en nuage de points, représentant le nombre de diarrhée(s) par chien des groupes Verrum, Placebo et Protéostress au cours de la LGO, ainsi que les moyennes du nombre de diarrhée par chien de chaque groupe (Peytoureau F., 2020)

Il semblerait que l'incidence des diarrhées soit plus faible dans le groupe des chiens recevant le Protéostress® par rapport aux groupes Placebo et Négatifs.

L'étude statistique par le test de Mann-Whitney-Wilcoxon visant à comparer l'incidence des diarrhées n'a cependant pas permis de prouver que cette différence était significative. En effet les résultats obtenus sont les suivants :

- Une p-value de 0,33 (>0,05) lors de la comparaison de l'incidence des diarrhées des groupes Verrum et Placebo
- Une p-value de 0,83 (>0,05) lors de la comparaison de l'incidence des diarrhées des groupes Verrum et Négatif
- Une p-value de 0,65 (>0,05) lors de la comparaison de l'incidence des diarrhées des groupes Placebo et Négatif

## V. Discussion

Cette étude visant à étudier l'effet d'une supplémentation en *Porphyra umbilicalis* sur le taux de CK, ASAT, ALAT et CRP sanguins après la course, ainsi que sur l'incidence des diarrhées pendant la course, n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de ces paramètres entre les chiens recevant le Protéostress®, le Placebo, et ne recevant aucun traitement pendant la course.

Principalement pour des questions de budgets, nous n'avons pas dosé de paramètres directs et spécifiques du stress oxydatif tels que les produits d'oxydation des protéines, de l'ADN ou des acides gras, dont nous avons précédemment étudié les propriétés.

N'ayant pas évalué ces paramètres, il est difficile d'affirmer que le *Porphyra* n'a pas d'effet antioxydant significatif chez le chien de traîneau pendant une course.

De plus nous pouvons nous demander si le Protéostress® ne permettrait pas d'augmenter les performances sportives des chiens de traîneau lors d'une course de moyenne distance. Si telle était le cas, nous pourrions supposer que cette amélioration des performances sportives serait à l'origine d'une augmentation des CK chez les chiens traités avec le Protéostress®, ce qui modifierait notre interprétation de ce paramètre. Il serait donc par exemple intéressant de réaliser une étude ultérieure concernant l'influence de la supplémentation en Protéostress® sur la performance sportive des chiens de traîneau, étude statistique que nous ne pouvons pas réaliser avec notre protocole, puisque chaque attelage était composé de chiens complémentés et non complémentés, allant par définition tous à la même allure.

Il aurait également été intéressant d'étudier l'incidence et la nature des lésions musculaires, et notamment des rhabdomyolyses d'effort pendant la course, puisque nous avons vu que ces lésions pouvaient être aggravées par le stress oxydatif. Cela avait été prévu par le laboratoire Wamine®, via l'impression de carnets de route qui devait être remplis chaque jour par les mushers. Or aucun des mushers de l'étude n'a eu le temps de remplir ces carnets pour chacun de leur chien. Si l'étude est poursuivie, il serait d'avantage intéressant de pouvoir discuter chaque jour avec les mushers de l'état clinique de leurs chiens, afin d'obtenir et de noter des données concernant les lésions musculaires et gastro-intestinales.

Enfin, les tests statistiques non paramétriques que nous avons réalisés sont peu puissants, et donc avec un risque de 2<sup>ème</sup> espèce élevé, du fait du faible nombre de chiens inclus dans l'étude. Or le risque de 2<sup>ème</sup> espèce représente la probabilité de conclure à une équivalence d'un médicament et d'un placebo, alors qu'ils ne le sont pas en réalité. Par manque de puissance de notre test statistique, il est donc possible que nous ayons conclu à une équivalence des propriétés de nos 3 traitements, alors qu'elles ne le sont pas en réalité.

Ainsi, nous n'avons pas pu conclure à des différences significatives concernant les propriétés antioxydantes du Protéostress® et du Placebo, mais cela pourrait venir notamment d'un manque de spécificité des paramètres testés et d'un manque de puissance de nos tests statistiques, pouvant être lié au nombre insuffisant de chiens inclus dans le protocole.



## CONCLUSION

Ce travail nous aura permis de détailler les causes, les conséquences et les mécanismes du stress oxydatif chez le chien de traîneau en course. Ce stress est aujourd'hui un sujet majeur de recherche chez les athlètes humains, et nous avons vu qu'il le devient également chez le chien de sport, et plus particulièrement le chien de traîneau. En effet il paraît important de contrer certains effets du stress oxydatif, puisque nous avons vu qu'il pouvait être un facteur aggravant de certaines affections à court et à long terme.

En ce sens, de nombreuses substances antioxydantes, comme la vitamine E et la vitamine C, ont déjà montré leurs propriétés antioxydantes chez le chien de traîneau en course.

En revanche les propriétés antioxydantes du *Porphyra umbilicalis* n'avaient jamais été étudiées chez le chien de traîneau. Seules des études *in vitro* avaient permis de montrer leurs capacités à diminuer le stress oxydatif cellulaire, via la stimulation de l'expression de la protéine Hsp70.

Ainsi notre étude visait à étudier les propriétés antioxydantes *in vivo* du *Porphyra umbilicalis* chez le chien de traîneau en compétition.

Si nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différence significative entre certains paramètres biochimiques et cliniques des chiens complémentés et non complémentés en *Porphyra umbilicalis* pendant la course, cela ne prouve pas avec certitude que cette algue rouge n'a pas eu un effet antioxydant chez les chiens traités. En effet le manque de spécificité de nos paramètres pour le stress oxydatif, ainsi que la faible puissance de nos tests statistiques, nous permettent de nuancer les résultats obtenus dans notre étude.

Ainsi il serait très intéressant de continuer cette étude en essayant de recruter un nombre de chiens supérieur, et en dosant certains paramètres spécifiques du stress oxydatif, que nous avons détaillé dans la partie bibliographique de ce travail.



# Bibliographie

ABDOLLAHI, Mohammad, RANJBAR, Akram, SHADNIA, Shahin, NIKFAR, Shekoufeh et REZAIE, Ali, 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004. pp. 8.

ALESSIO, Helaine M., 2000. Lipid peroxidation in healthy and diseased models: influence of different types of exercise. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Elsevier. pp. 115-127.

ANDREYEV, A Yu, KUSHNAREVA, Yu E et STARKOV, A A, 2005. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. . 2005. Vol. 70, n° 2, pp. 15.

ASKEW, E.W., 2002. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology.* novembre 2002. Vol. 180, n° 2, pp. 107-119.

ASMUS, Klaus-Dieter, 2000. Free radical chemistry. *Handbook of Oxidant and Antioxidants.* 2000. pp. 1-52.

AZZAM, Edouard I., JAY-GERIN, Jean-Paul et PAIN, Debkumar, 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters.* décembre 2012. Vol. 327, n° 1-2, pp. 48-60.

BAEZA, Armelle et MARANO, Francelyne, 2007. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires: Un rôle central pour le stress oxidant. *médecine/sciences.* mai 2007. Vol. 23, n° 5, pp. 497-501.

BANSE, Heidi E, SIDES, Raymond H, RUBY, Brent C et BAYLY, Warwick M, 2007. Effects of endurance training on VO<sub>2</sub>max and submaximal blood lactate concentrations of untrained sled dogs. *Equine and Comparative Exercise Physiology.* mai 2007. Vol. 4, n° 2, pp. 89-94.

BASKIN, Carole R., HINCHCLIFF, Kenneth W., DISILVESTRO, Robert A., REINHART, Gregg A., HAYEK, Michael G., CHEW, Boon P., BURR, John R. et SWENSON, Richard A., 2000. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *American Journal of Veterinary Research.* août 2000. Vol. 61, n° 8, pp. 886-891.

BECKMAN, Joseph S et FREEMAN, Bruce A, 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Medical Sciences.* 1990. pp. 5.

BECKMAN, Kenneth B. et AMES, Bruce N., 2000. Oxidants and aging. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Elsevier. pp. 755-796.

BEDARD, Karen et KRAUSE, Karl-Heinz, 2007. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews.* janvier 2007. Vol. 87, n° 1, pp. 245-313.

BEERDA, Bonne, SCHILDER, Matthijs B.H, VAN HOOFF, Jan A.R.A.M, DE VRIES, Hans W et MOL, Jan A, 1999. Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. I. Behavioral Responses. *Physiology & Behavior.* avril 1999. Vol. 66, n° 2, pp. 233-242.

BEERS, R. et SIZER, I., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. . *The Journal of Biochemical Chemistry.* 1952. pp. 133-140.

BENTINGER, Magnus, TEKLE, Michael et DALLNER, Gustav, 2010. Coenzyme Q – Biosynthesis and functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. mai 2010. Vol. 396, n° 1, pp. 74-79.

BRAND, Martin D., 2016. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. novembre 2016. Vol. 100, pp. 14-31.

CADENAS, Enrique et DAVIES, Kelvin J A, 2000. MITOCHONDRIAL FREE RADICAL GENERATION, OXIDATIVE STRESS, AND AGING. *oxidative stress*. 2000. pp. 9.

CARON, A., 1999. *Mise en évidence par ultrasonographie doppler pulsé et analyse de l'effet vasoconstricteur de trois solutions d'hémoglobine humaine modifiée chimiquement*. Institut national polytechnique de Lorraine.

CILLARD, Josiane et CILLARD, Pierre, 2006. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. janvier 2006. Vol. 13, n° 1, pp. 24-29.

CLARKE, Robert W, COULL, Brent, REINISCH, Ulrike, CATALANO, Paul, KILLINGSWORTH, Cheryl R, KOUTRAKIS, Petros, KAVOURAS, Ilias, MURTHY, Gopala Gazula Krishna, LAWRENCE, Joy, LOVETT, Eric, WOLFSON, J Mikhail, VERRIER, Richard L et GODLESKI, John J, 2000. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environmental Health Perspectives*. 2000. Vol. 108, n° 12, pp. 9.

COQUART, J., 2016. *Mesure de l'effort dans les activités physiques*.

CORTÉS-RÍOS, J., TORRES, M.J., CAMPOS-BUSTAMANTE, M.P., ROMERO-PARRA, J., LETELIER, M.E., PESSOA-MAHANA, D., CHUNG, H. et FAÚNDEZ, M., 2017. NADPH oxidase activity: Spectrophotometric determination of superoxide using pyrogallol red. *Analytical Biochemistry*. novembre 2017. Vol. 536, pp. 96-100.

COTTONE, S, MULE, G, NARDI, E, VADALA, A, GUARNERI, M, BRILOTTA, C, ARSENA, R, PALERMO, A, RICCOBENE, R et CERASOLA, G, 2006. Relation of C-Reactive Protein to Oxidative Stress and to Endothelial Activation in Essential Hypertension. *American Journal of Hypertension*. mars 2006. Vol. 19, n° 3, pp. 313-318.

COYLE, E. F., COGGAN, A. R., HOPPER, M. K. et WALTERS, T. J., 1988. Determinants of endurance in well-trained cyclists. *Journal of Applied Physiology*. 1 juin 1988. Vol. 64, n° 6, pp. 2622-2630.

CRACOWSKI, J, TREMEL, F, MARPEAU, C, BAGUET, J, STANKE-LABESQUE, F, MALLION, J, BESSARD, G et BAXTER, G, 2000. Increased formation of F2-isoprostanes in patients with severe heart failure. *Heart*. 2000. Vol. 84, n° 4, pp. 439-440.

DAVIS, M S, WILLARD, M D, NELSON, S L, MANDSAGER, R E, MCKIERNAN, B S, MANSELL, J K et LEHENBAUER, T W, 2003. Prevalence of Gastric Lesions in Racing Alaskan Sled Dogs. . 2003. Vol. Journal of Veterinary Internal Medicine, pp. 4.

DAVIS, Michael S, WILLARD, Michael D, WILLIAMSON, Katherine K, STEINER, Jorg M et WILLIAMS, David A, 2005. Sustained Strenuous Exercise Increases Intestinal Permeability in Racing Alaskan Sled Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2005. N° 19, pp. 34-39.

- DE CARVALHO, Flávia G., GALAN, Bryan S. M., SANTOS, Priscila C., PRITCHETT, Kelly, PFRIMER, Karina, FERRIOLLI, Eduardo, PAPOTI, Marcelo, MARCHINI, Júlio S. et DE FREITAS, Ellen C., 2017. Taurine: A Potential Ergogenic Aid for Preventing Muscle Damage and Protein Catabolism and Decreasing Oxidative Stress Produced by Endurance Exercise. *Frontiers in Physiology*. 20 septembre 2017. Vol. 8, pp. 710.
- DE OLIVEIRA, Erick Prado, BURINI, Roberto Carlos et JEUKENDRUP, Asker, 2014. Gastrointestinal Complaints During Exercise: Prevalence, Etiology, and Nutritional Recommendations. *Sports Medicine*. mai 2014. Vol. 44, n° S1, pp. 79-85.
- DEATON, Christopher M. et MARLIN, David J., 2003. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. septembre 2003. Vol. 2, n° 3, pp. 278-291.
- DECKER, Eric A. et CLARKSON, Priscilla M., 2000. Dietary sources and bioavailability of essential and nonessential antioxidants. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 323-358.
- DEL RÍO, Luis A. et LÓPEZ-HUERTAS, Eduardo, 2016. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant and Cell Physiology*. 14 avril 2016. pp. pcw076.
- DEVAL, Veronica C., GOGGS, Robert, HANSEN, Christina, FRYE, Christopher W., LETENDRE, Jo-Annie et WAKSHLAG, Joseph J., 2018. Serum myoglobin, creatine kinase, and cell-free DNA in endurance sled dogs and sled dogs with clinical rhabdomyolysis: Rhabdomyolysis in sled dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. juillet 2018. Vol. 28, n° 4, pp. 310-316.
- DINICOLANTONIO, James J, MCCARTY, Mark F et O'KEEFE, James H, 2018. Antioxidant bilirubin works in multiple ways to reduce risk for obesity and its health complications. *Open Heart*. octobre 2018. Vol. 5, n° 2, pp. e000914.
- D'ORAZIO, John, JARRETT, Stuart, AMARO-ORTIZ, Alexandra et SCOTT, Timothy, 2013. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*. 7 juin 2013. Vol. 14, n° 6, pp. 12222-12248.
- DOSEK, Agoston, OHNO, Hideko, ACS, Zoltan, TAYLOR, Albert W. et RADAK, Zsolt, 2007. High altitude and oxidative stress. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. septembre 2007. Vol. 158, n° 2-3, pp. 128-131.
- DUNLAP, Kriya L., REYNOLDS, Arleigh J. et DUFFY, Lawrence K., 2006. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. avril 2006. Vol. 143, n° 4, pp. 429-434.
- FÉDÉRATION FRANÇAISE DES SPORTS DE TRAÎNEAU, 2019. Disciplines – FFST. [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.ffst.info/les-sports/disciplines/>
- FERNANDES, Peter M et DAVENPORT, Richard J, 2019. How to do it: investigate exertional rhabdomyolysis (or not). *Practical Neurology*. février 2019. Vol. 19, n° 1, pp. 43-48.
- FORSTERMANN, U. et SESSA, W. C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 1 avril 2012. Vol. 33, n° 7, pp. 829-837.
- FOURIEZ-LABLÉE, V., 2004. *Les affections musculaires chez le chien de sport*. Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort.

- FULCO, C., ROCK, P. et CYMERMAN, A., 1998. Maximal and submaximal exercise performance at altitude. *Aviation, space and environmental medicine*. août 1998. pp. 793-801.
- GARDÈS-ALBERT, Monique, BONNEFONT-ROUSSELOT, Dominique et ABEDINZADEH, Zohreh, 2003. Espèces réactives de l'oxygène. . décembre 2003. pp. 6.
- GOMEZ-CABRERA, Mari-Carmen, DOMENECH, Elena et VIÑA, Jose, 2008. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*. janvier 2008. Vol. 44, n° 2, pp. 126-131.
- GRADINARU, Daniela, BORSA, Claudia, IONESCU, Cristina et PRADA, Gabriel Ioan, 2015. Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. novembre 2015. Vol. 151, pp. 101-113.
- GRANDJEAN, D., MOQUET, N., PAWLOWIEZ, S., TOURTEBATTE, A.K., CACCIANI, F. et BACQUE, H., 2002. *Guide pratique du chien de sport et d'utilité, Deuxième Edition*. Aniwa Publishing.
- GRANDJEAN, D., 2006. *Tout savoir sur ces nutriments qui nourrissent, préviennent et guérissent chiens et chats*. 2006.
- GRANDJEAN, Dominique, 2001. Le stress oxydatif cellulaire chez le chien : conséquences et prévention nutritionnelle. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2001. N° 3\_sup, pp. 49.
- GUESNET, Philippe, ALESSANDRI, Jean-Marc, ASTORG, Pierre, PIFFERI, Fabien et LAVIALLE, Monique, 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux, Corps gras, Lipides*. septembre 2005. Vol. 12, n° 5-6, pp. 333-343.
- HALENG, J., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J.O., CHARLIER, C. et CHAPELLE, J.P., 2007. Le stress oxydant. . 2007.
- HALLIWELL, B. et CHIRICO, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Society for Clinical Nutrition*. 1993. pp. 715-725.
- HALLIWELL, Barry, 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*. mai 2012. Vol. 70, n° 5, pp. 257-265.
- HAN, D., LOUKIANOFF, S. et MCLAUGHLIN, L., 2000. Oxidative stress indices: analytical aspects and significance. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. pp. 433-484.
- HARTMANN, Andreas, 2000. Oxidative DNA damage in exercise. . 2000. Vol. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise, pp. 195-217.
- HAZELL, L J, VAN DEN BERG, J J M et STOCKER, R, 1994. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochemical Journal*. 15 août 1994. Vol. 302, n° 1, pp. 297-304.
- HEAD, E., LIU, J., HAGEN, T. M., MUGGENBURG, B. A., MILGRAM, N. W., AMES, B. N. et COTMAN, C. W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging: Oxidative damage in aged canine brain. *Journal of Neurochemistry*. 3 juillet 2002. Vol. 82, n° 2, pp. 375-381.
- HEFFERNAN, Shane, HORNER, Katy, DE VITO, Giuseppe et CONWAY, Gillian, 2019. The Role of Mineral and Trace Element Supplementation in Exercise and Athletic Performance: A Systematic Review. *Nutrients*. 24 mars 2019. Vol. 11, n° 3, pp. 696.

HELLSTEN, Y., 2000. The role of xanthine oxidase in exercise. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 153-176.

HINCHCLIFF, Kenneth W., REINHART, Gregory A., DISILVESTRO, Robert, REYNOLDS, Arleigh, BLOSTEIN-FUJII, Ashley et SWENSON, Richard A., 2000. Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *American Journal of Veterinary Research*. mai 2000. Vol. 61, n° 5, pp. 512-517.

HOLLANDER, J., FIEBIG, R., GORE, M., BEJMA, J., OOKAWARA, T., OHNO, H. et JI, L. L., 1999. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1 septembre 1999. Vol. 277, n° 3, pp. R856-R862.

HUSSAIN, Tarique, TAN, Bie, YIN, Yulong, BLACHIER, Francois, TOSSOU, Myrlene C. B. et RAHU, Najma, 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Vol. 2016, pp. 1-9.

INSPQ, 2016. Altitude et acclimatation. *INSPQ*. 2016. pp. 16.

IVANOV, Iliya V., MAPPES, Timo, SCHAUPP, Patrick, LAPPE, Christian et WAHL, Siegfried, 2018. Ultraviolet radiation oxidative stress affects eye health. *Journal of Biophotonics*. juillet 2018. Vol. 11, n° 7, pp. e201700377.

JACKSON, Malcolm J., 2000. Exercise and oxygen radical production by muscle. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 57-68.

JAFFREZIC, Marjorie, 2020. Histoire du sport de traîneau. *Lekkarod* [en ligne]. 2020. Disponible à l'adresse : <http://www.lekkarod.com/fr/histoire-du-sport-de-traineau/>

JASTRZĘBSKI, Zbigniew, ŻYCHOWSKA, Małgorzata, RADZIMIŃSKI, Łukasz, KONIECZNA, Anna et KORTAS, Jakub, 2015. Damage to Liver and Skeletal Muscles in Marathon Runners During a 100 km Run With Regard to Age and Running Speed. *Journal of Human Kinetics*. 1 mars 2015. Vol. 45, n° 1, pp. 93-102.

JENKINS, Robert R. et BEARD, John, 2000. Metal binding agents: possible role in exercise. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 129-152.

Ji, LiLi, 1995. Oxidative stress during exercise: Implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology and Medicine*. juin 1995. Vol. 18, n° 6, pp. 1079-1086.

KANTER, Mitchell M., LESMES, George R., KAMINSKY, Leonard A., LA HAM-SAEGER, Janet et NEQUIN, Noel D., 1988. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race: Relationship to lipid peroxidation. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. janvier 1988. Vol. 57, n° 1, pp. 60-63.

KELLOGG, Dean L., MCCAMMON, Karen M., HINCHEE-RODRIGUEZ, Kathryn S., ADAMO, Martin L. et ROMAN, Linda J., 2017. Neuronal nitric oxide synthase mediates insulin- and oxidative stress-induced glucose uptake in skeletal muscle myotubes. *Free Radical Biology and Medicine*. septembre 2017. Vol. 110, pp. 261-269.

KHATTAB, Hala A.H., ABDALLAH, Inas Z.A., YOUSEF, Fatimah M. et HUWAIT, Etimad A., 2017. Efficiency of borage seeds oil against gamma irradiation-induced hepatotoxicity in male rats : possible antioxidant activity. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 5 juin 2017. Vol. 14, n° 4, pp. 169-179.

- KING, Michelle A., CLANTON, Thomas L. et LAITANO, Orlando, 2016. Hyperthermia, dehydration, and osmotic stress: unconventional sources of exercise-induced reactive oxygen species. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 15 janvier 2016. Vol. 310, n° 2, pp. R105-R114.
- KNEEPKENS, C M Frank, LEPAGE, G U Y et ROY, CLAUDE C, 1994. The potential of hydrocarbone breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1994. Vol. 17, n° 2, pp. 127-160.
- KOH, Eugene et FLUHR, Robert, 2016. Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations. *Plant Signaling & Behavior*. 2 juillet 2016. Vol. 11, n° 7, pp. e1192742.
- KOZAKOWSKA, Magdalena, PIETRASZEK-GREMPLEWICZ, Katarzyna, JOZKOWICZ, Alicja et DULAK, Jozef, 2015. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. décembre 2015. Vol. 36, n° 6, pp. 377-393.
- KUDRYAVTSEVA, Anna V., KRASNOV, George S., DMITRIEV, Alexey A., ALEKSEEV, Boris Y., KARDYMON, Olga L., SADRIDINOVA, Asiya F., FEDOROVA, Maria S., POKROVSKY, Anatoly V., MELNIKOVA, Nataliya V., KAPRIN, Andrey D., MOSKALEV, Alexey A. et SNEZHKINA, Anastasiya V., 2016. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 19 juillet 2016. Vol. 7, n° 29.
- KUJOTH, G. C., 2005. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science*. 15 juillet 2005. Vol. 309, n° 5733, pp. 481-484.
- LA GRANDE ODYSSEE SAVOIE MONT BLANC, 2019. Les chiens - les Races. *La Grande Odyssee Savoie Mont Blanc* [en ligne]. 4 septembre 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.grandeodyssee.com/races/>
- LA GRANDE ODYSSEE SAVOIE MONT BLANC, 2020. La course - Présentation. *La Grande Odyssee Savoie Mont Blanc* [en ligne]. 2020. Disponible à l'adresse : <https://www.grandeodyssee.com/la-course-presentation/>
- LE POINT VÉTÉRINAIRE, 2019. PROTEOSTRESS® Petits Animaux - Médicament. *Le Point Vétérinaire.fr* [en ligne]. 2019. Disponible à l'adresse : <https://www.lepointveterinaire.fr/dmv/consulter/M0279-/proteostress-petits-animaux.html>
- LEE, Sung Ryul, 2018. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 20 mars 2018. Vol. 2018.
- LENZI, F., 2011. *Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint*. Vetagro-sup.
- LEONHARDT, M., GEBERT, S. et WENK, C., 1997. Vitamin E content of different animal products: Influence of animal nutrition. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. mars 1997. Vol. 36, n° 1, pp. 23-27.
- LEVINE, Benjamin D. et STRAY-GUNDERSEN, James, 1997. "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. *Journal of Applied Physiology*. 1 juillet 1997. Vol. 83, n° 1, pp. 102-112.
- LIPPI, Giuseppe et SANCHIS-GOMAR, Fabian, 2019. Epidemiological, biological and clinical update on exercise-induced hemolysis. *Annals of Translational Medicine*. juin 2019. Vol. 7, n° 12, pp. 270-270.



- MARGARITELIS, N. V., THEODOROU, A. A., PASCHALIS, V., VESKOUKIS, A. S., DIPLA, K., ZAFEIRIDIS, A., PANAYIOTOU, G., VRABAS, I. S., KYPAROS, A. et NIKOLAIDIS, M. G., 2018. Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. *Acta Physiologica*. février 2018. Vol. 222, n° 2, pp. e12898.
- MARKLUND, Stefan et MARKLUND, Gudrun, 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*. septembre 1974. Vol. 47, n° 3, pp. 469-474.
- MARSHALL, Rebecca J., SCOTT, Karen C., HILL, Richard C., LEWIS, Daniel D., SUNDSTROM, Deborah, JONES, Galin L. et HARPER, Jean, 2002. Supplemental Vitamin C Appears to Slow Racing Greyhounds. *The Journal of Nutrition*. 1 juin 2002. Vol. 132, n° 6, pp. 1616S-1621S.
- MASSARO, Marika, SCODITTI, Egeria, CARLUCCIO, Maria, KALTSATOU, Antonia et CICHELLA, Antonio, 2019. Effect of Cocoa Products and Its Polyphenolic Constituents on Exercise Performance and Exercise-Induced Muscle Damage and Inflammation: A Review of Clinical Trials. *Nutrients*. 28 juin 2019. Vol. 11, n° 7, pp. 1471.
- MASUDA, Daisaku et YAMASHITA, Shizuya, 2017. Postprandial Hyperlipidemia and Remnant Lipoproteins. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2017. Vol. 24, n° 2, pp. 95-109.
- MAYNAR, M., BARTOLOMÉ, I., ALVES, J., BARRIENTOS, G., GRIJOTA, F. J., ROBLES, M. C. et MUÑOZ, D., 2019. Influence of a 6-month physical training program on serum and urinary concentrations of trace metals in middle distance elite runners. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. décembre 2019. Vol. 16, n° 1, pp. 53.
- MCMICHAEL, Maureen A., 2007. Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. septembre 2007. Vol. 231, n° 5, pp. 714-720.
- MIGDAL, Camille et SERRES, Mireille, 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. avril 2011. Vol. 27, n° 4, pp. 405-412. DOI 10.1051/medsci/2011274017.
- MIKAMI, T. et SORIMACHI, M., 2017. Uric Acid Contributes Greatly to Hepatic Antioxidant Capacity Besides Protein. *Physiological Research*. 30 décembre 2017. pp. 1001-1007.
- MIYAMOTO, Sayuri, MARTINEZ, Glaucia R., MEDEIROS, Marisa H.G. et DI MASCIO, Paolo, 2014. Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. octobre 2014. Vol. 139, pp. 24-33.
- MOBERG, G.P., 2000. Biological response to stress - implication for animal welfare. In : *The Biology of Animal Stress*. pp. 1-21.
- MORTON, James P., MACLAREN, Don P. M., CABLE, Nigel T., BONGERS, Thomas, GRIFFITHS, Richard D., CAMPBELL, Iain T., EVANS, Louise, KAYANI, Anna, MCARDLE, Anne et DRUST, Barry, 2006. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*. juillet 2006. Vol. 101, n° 1, pp. 176-182.
- MOTTA, S., LETELLIER, C., ROPERT, M., MOTTA, C. et THIÉBAULT, J.J., 2009. Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs as assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity. *The Veterinary Journal*. septembre 2009. Vol. 181, n° 3, pp. 288-295.

NANDI, Ankita, YAN, Liang-Jun, JANA, Chandan Kumar et DAS, Nilanjana, 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 11 novembre 2019. Vol. 2019, pp. 1-19.

NILSSON, Mats I., BOURGEOIS, Jacqueline M., NEDERVEEN, Joshua P., LEITE, Marlon R., HETTINGA, Bart P., BUJAK, Adam L., MAY, Linda, LIN, Ethan, CROZIER, Michael, RUSIECKI, Daniel R., MOFFATT, Chris, AZZOPARDI, Paul, YOUNG, Jacob, YANG, Yifan, NGUYEN, Jenny, ADLER, Ethan, LAN, Lucy et TARNOPOLSKY, Mark A., 2019. Lifelong aerobic exercise protects against inflammaging and cancer. *PLOS ONE*. 25 janvier 2019. Vol. 14, n° 1, pp. 1-25.

ODDOZE, C., LOMBARD, E. et PORTUGAL, H., 2012. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma | Elsevier Enhanced Reader. *The Canadian Society of Clinical Chemists*. Elsevier. CHU Timone, Marseille, 2012. pp. 464-469.

OHIA, Sunny E., OPERE, Catherine A. et LEDAY, Angela M., 2005. Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. novembre 2005. Vol. 579, n° 1-2, pp. 22-36.

OLGUNER, Mustafa, AKTUG, Tanju et ZER, Erdener O, 2002. Short-Term Intestinal Ischemia–Reperfusion Alters Intestinal Motility that Can Be Preserved by Xanthine Oxidase Inhibition. *Digestive Diseases and Sciences*. 2002. Vol. 47, n° 6, pp. 5.

ORLANDO, Patrick, SILVESTRI, Sonia, GALEAZZI, Roberta, ANTONICELLI, Roberto, MARCHEGGIANI, Fabio, CIRILLI, Ilenia, BACCHETTI, Tiziana et TIANO, Luca, 2018. Effect of ubiquinol supplementation on biochemical and oxidative stress indexes after intense exercise in young athletes. *Redox Report*. janvier 2018. Vol. 23, n° 1, pp. 136-145.

PASCHALIS, Vassilis, THEODOROU, Anastasios A., MARGARITELIS, Nikos V., KYPAROS, Antonios et NIKOLAIDIS, Michalis G., 2018. N-acetylcysteine supplementation increases exercise performance and reduces oxidative stress only in individuals with low levels of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*. février 2018. Vol. 115, pp. 288-297.

PERONNET, F., NADEAU, R., DE CHAMPLAIN, J. et CHARTRAND, C., 1982. Plasma catecholamines, heart rate, and cardiac sympathetic activity in exercising dogs. In : *Medecine and science in sports and exercise*. pp. 281-285.

PEYRONNET, B., 2017. *Iditarod la dernière course de Nicolas Vanier*. Vidéo France Télévision Distribution, 2017.

PHAN-THI, Hanh, 2014. *Utilisation des caroténoïdes naturels de Momordica cochinchinensis (gac) comme composés santé: extraction et bioactivité en fonction de l'origine et du procédé*. Université de Bourgogne Sciences des Aliments.

PIERCY, Richard J., HINCHCLIFF, Kenneth W., DISILVESTRO, Robert A., REINHART, Gregory A., BASKIN, Carole R., HAYEK, Michael G., BURR, John R. et SWENSON, Richard A., 2000. Effect of dietary supplements containing antioxidants on attenuation of muscle damage in exercising sled dogs. *American Journal of Veterinary Research*. novembre 2000. Vol. 61, n° 11, pp. 1438-1445.

PIERCY, Richard J, HINCHCLIFF, Kenneth W, MORLEY, Paul S, DISILVESTRO, Robert A, REINHART, Gregory A, NELSON, Stuart L, SCHMIDT, Karin E et CRAIG, A.Morrie, 2001. Vitamin E and exertional rhabdomyolysis during endurance sled dog racing. *Neuromuscular Disorders*. avril 2001. Vol. 11, n° 3, pp. 278-286.

PILEJE, 2020. PiLeJe | Développement d'ingrédients spécifiques. [en ligne]. 2020. Disponible à l'adresse : <https://www.pileje.fr/expertises/micronutrition/ingredients-specifiques>

PINEAU, V., 2016. *Impact d'un extrait standardisé d'une algue rouge Porphyra umbilicalis PORPHYRAL HSP ND, sur Hsp72, IL-6 et TNF- $\alpha$* . Thèse de doctorat vétérinaire. Oniris, Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique : Faculté de médecine de Nantes.

PINGITORE, Alessandro, LIMA, Giuseppina Pace Pereira, MASTORCI, Francesca, QUINONES, Alfredo, IERVASI, Giorgio et VASSALLE, Cristina, 2015. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. juillet 2015. Vol. 31, n° 7-8, pp. 916-922.

PINTA, M., 1973. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux : détermination des éléments Ca, Mg, Fe, Mn, Zn et Cu par absorption atomique. *Oléagineux*. 1973. Vol. 2, pp. 87-92.

PORTIER, K., 2007. *Effets de l'oxygénation et de l'exercice sur la fluidité membranaire de l'érythrocyte du cheval*. 2007.

POWERS, Scott K. et JACKSON, Malcolm J., 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*. octobre 2008. Vol. 88, n° 4, pp. 1243-1276.

POWERS, Scott K. et SEN, Chandan K., 2000. Physiological antioxidants and exercise training. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* [en ligne]. Elsevier. pp. 221-242.

PRAZ, Caroline, JAGDEEP, Steve, PRAZ, Manu et DÉRIAZ, Olivier, 2011. Coût énergétique de la course en montée et en descente chez les coureurs entraînés pour la course de montagne. In : *Sportmedizin und Sporttraumatologie*. pp. 40-44.

PRÜTZ, Walter A., 1996. Hypochlorous Acid Interactions with Thiols, Nucleotides, DNA, and Other Biological Substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. août 1996. Vol. 332, n° 1, pp. 110-120.

QUINDRY, John, DUMKE, Charles, SLIVKA, Dustin et RUBY, Brent, 2016. Impact of extreme exercise at high altitude on oxidative stress in humans: Extreme exercise and oxidative stress. *The Journal of Physiology*. 15 septembre 2016. Vol. 594, n° 18, pp. 5093-5104.

R Core Team, 2019. [en ligne]. Vienna, Austria : R Foundation for Statistical Computing. Disponible à l'adresse : <https://www.R-project.org/>

RADAK, Zsolt, SUZUKI, Katsuhiko, HIGUCHI, Mitsuru, BALOGH, Laszlo, BOLDOGH, Istvan et KOLTAI, Erika, 2016. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radical Biology and Medicine*. septembre 2016. Vol. 98, pp. 187-196.

RAICHVARG, D, GUENOUNOU, M et ZENOU, M, 1981. Phagocytose et mécanismes bactéricides du polynucléaire neutrophile. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1981. N° 11, pp. 581-587.

REBERT, D., 2010. *Contribution à l'étude des affections spécifiques du chien de traîneau en course : étude épidémiologique des affections lors de « la Grande Odyssée Savoie 2008 » et comparaison avec les données de l'Alpirod 1993/1994*. Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort.

REID, M. B., KHAWLI, F. A. et MOODY, M. R., 1993. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of Applied Physiology*. 1 septembre 1993. Vol. 75, n° 3, pp. 1081-1087.

- REID, Michael B., 2000. Muscle fatigue: mechanisms and regulation. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 599-630.
- REUTER, Simone, GUPTA, Subash C., CHATURVEDI, Madan M. et AGGARWAL, Bharat B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. décembre 2010. Vol. 49, n° 11, pp. 1603-1616.
- ROBINSON, Wayne F. et ROBINSON, Nicholas A., 2016. Cardiovascular System. In : *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3*. Elsevier. pp. 57.
- ROBLEDINOS-ANTÓN, Natalia, FERNÁNDEZ-GINÉS, Raquel, MANDA, Gina et CUADRADO, Antonio, 2019. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 14 juillet 2019. Vol. 2019, pp. 1-20.
- ROCHCONGAR, P. et MONOD, H., 2009. *Médecine du sport*. Elsevier.
- ROSE, R.J. et BLOOMBERG, M.S., 1989. Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on haematology, serum biochemistry and muscle metabolites. *Research in Veterinary Science*. septembre 1989. Vol. 47, n° 2, pp. 212-218.
- ROUDEBUSH, Philip, ZICKER, Steven C., COTMAN, Carl W., MILGRAM, Norton W., MUGGENBURG, Bruce A. et HEAD, Elizabeth, 2005. Nutritional management of brain aging in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. septembre 2005. Vol. 227, n° 5, pp. 722-728.
- ROYER, Christopher M, WILLARD, Michael, WILLIAMSON, Katherine, STEINER, Jörg M, WILLIAMS, David A et DAVID, Michael, 2005. Exercise stress, intestinal permeability and gastric ulceration in racing Alaskan sled dogs. *Equine and Comparative Exercise Physiology*. février 2005. Vol. 2, n° 1, pp. 53-59.
- SACHDEV, Sean et DAVIES, Kelvin J.A., 2008. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. janvier 2008. Vol. 44, n° 2, pp. 215-223.
- SACHECK, Jennifer M et BLUMBERG, Jeffrey B, 2001. Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercise. . 2001. Vol. 17, n° 10, pp. 7.
- SAHA, Subbroto Kumar, LEE, Soo Bin, WON, Jihye, CHOI, Hye Yeon, KIM, Kyeongseok, YANG, Gwang-Mo, DAYEM, Ahmed Abdal et CHO, Ssang-goo, 2017. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 juillet 2017. Vol. 18, n° 7, pp. 1544.
- SANCHIS-GOMAR, F., PAREJA-GALEANO, H., PEREZ-QUILIS, C., SANTOS-LOZANO, A., FIUZA-LUCES, C., GARATACHEA, N., LIPPI, G. et LUCIA, A., 2015. Effects of allopurinol on exercise-induced muscle damage: new therapeutic approaches? *Cell Stress and Chaperones*. janvier 2015. Vol. 20, n° 1, pp. 3-13.
- SANTOS, Susana, FERREIRA, Tiago, ALMEIDA, José, PIRES, Maria J., COLAÇO, Aura, LEMOS, Sílvia, GIL DA COSTA, Rui M., MEDEIROS, Rui, BASTOS, Margarida M. S. M., NEUPARTH, Maria J., ABREU, Helena, PEREIRA, Rui, PACHECO, Mário, GAIVÃO, Isabel, ROSA, Eduardo et OLIVEIRA, Paula A., 2019. Dietary Supplementation with the Red Seaweed *Porphyra umbilicalis* Protects against DNA Damage and Pre-Malignant Dysplastic Skin Lesions in HPV-Transgenic Mice. *Marine Drugs*. 29 octobre 2019. Vol. 17, n° 11.

- SARMIENTO, Alvaro, DIAZ-CASTRO, Javier, PULIDO-MORAN, Mario, MORENO-FERNANDEZ, Jorge, KAJARABILLE, Naroa, CHIROSA, Ignacio, GUIBADO, Isabel M., JAVIER CHIROSA, Luis, GUIBADO, Rafael et OCHOA, Julio J., 2016. Short-term ubiquinol supplementation reduces oxidative stress associated with strenuous exercise in healthy adults: A randomized trial: Ubiquinol and Strenuous Exercise. *BioFactors*. 12 novembre 2016. Vol. 42, n° 6, pp. 612-622.
- SCHULER, B., THOMSEN, J. J., GASSMANN, M. et LUNDBY, C., 2007. Timing the arrival at 2340 m altitude for aerobic performance: Performance and acclimatization to altitude. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 20 février 2007. Vol. 17, n° 5, pp. 588-594.
- SEIDEL, Ulrike, HUEBBE, Patricia et RIMBACH, Gerald, 2019. Taurine: A Regulator of Cellular Redox Homeostasis and Skeletal Muscle Function. *Molecular Nutrition & Food Research*. août 2019. Vol. 63, n° 16, pp. 1800569.
- SEN, Chandan K. et GOLDFARB, Allan H., 2000. Antioxidants and physical exercise. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 297-320.
- SENA, Laura A. et CHANDEL, Navdeep S., 2012. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*. octobre 2012. Vol. 48, n° 2, pp. 158-167.
- SEYMOUR, Christopher W, CARLBOM, David, COOKE, Colin R, WATKINS, Timothy R, BULGER, Eileen M, REA, Thomas D et BAIRD, Geoffrey S, 2011. Temperature and time stability of whole blood lactate: implications for feasibility of pre-hospital measurement. *BMC Research Notes*. décembre 2011. Vol. 4, n° 1, pp. 169.
- SHERN-BREWER, Robin, SANTANAM, Nalini, WETZSTEIN, Carla, WHITE-WELKLEY, Jill E., PRICE, Larry et PARTHASARATHY, Sampath, 2000. The paradoxical relationship of aerobic exercise and the oxidative theory of atherosclerosis. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 1053-1067.
- SIES, Helmut, 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. mai 1993. Vol. 299, n° 3-4, pp. 183-191.
- SIGOGNEAU, M., 2019. *Étude observationnelle des facteurs de risques des troubles de performance des chiens de traîneaux lors de la Grande Odyssée 2019*. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- SOMANI, Satu M. et HUSAIN, Kazim, 2000. Influence of exercise-induced oxidative stress on the central nervous system. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 713-751.
- SONG, Yan-Jun, ZHONG, Chong-Bin et WANG, Xian-Bao, 2019. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury: SONG ET AL. *Journal of Cellular Physiology*. février 2019. Vol. 234, n° 2, pp. 1190-1207.
- SORMUNEN, Jorma, BÄCKMAND, Heli M., SARNA, Seppo, KUJALA, Urho M., KAPRIO, Jaakko, DYBA, Tadeusz et PUKKALA, Eero, 2014. Lifetime physical activity and cancer incidence—A cohort study of male former elite athletes in Finland. *Journal of Science and Medicine in Sport*. septembre 2014. Vol. 17, n° 5, pp. 479-484.
- SUGAMA, K., SUZUKI, K., YOSHITANI, K., SHIRAISHI, K., MIURA, S., YOSHIOKA, H., MORI, Y. et KOMETANI, T., 2015. Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following intensive endurance exercise. *Pathogenic mechanisms of redox/inflammatory responses to endurance exercise*. 2015. pp. 130-142.

SUZUKI, K., OHNO, H., OH-ISHI, S., KIZAKI, T., OOKAWARA, T., FUJII, J., RADÁK, Z. et TANIGUCHI, N., 2000. Superoxide dismutases in exercise and disease. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* [en ligne]. Elsevier. pp. 243-295.

TACHÉ, Yvette et MILLION, Mulugeta, 2015. Role of Corticotropin-releasing Factor Signaling in Stress-related Alterations of Colonic Motility and Hyperalgesia. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. janvier 2015. Vol. 21, n° 1, pp. 8-24.

TAKAYAMA, Fuminori, AOYAGI, Atsushi, TAKAHASHI, Keigo et NABEKURA, Yoshiharu, 2018. Relationship between oxygen cost and C-reactive protein response to marathon running in college recreational runners. *Open Access Journal of Sports Medicine*. novembre 2018. Vol. Volume 9, pp. 261-268.

TALEUX, A., 2019. *Influence de la ration alimentaire à l'entraînement et en course sur le score corporel, les performances sportives et la prévalence d'affections chez des chiens de traîneau : exemple lors de la Grande Odyssée*. Vetagro-sup.

TASSET-CUEVAS, Inmaculada, FERNÁNDEZ-BEDMAR, Zahira, LOZANO-BAENA, María Dolores, CAMPOS-SÁNCHEZ, Juan, DE HARO-BAILÓN, Antonio, MUÑOZ-SERRANO, Andrés et ALONSO-MORAGA, Ángeles, 2013. Protective Effect of Borage Seed Oil and Gamma Linolenic Acid on DNA: In Vivo and In Vitro Studies. *PLoS ONE*. 27 février 2013. Vol. 8, n° 2.

THANNICKAL, Victor J. et FANBURG, Barry L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1 décembre 2000. Vol. 279, n° 6, pp. L1005-L1028.

THEROND, P., 2006. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. novembre 2006. Vol. 64, n° 6, pp. 383-389.

THOMAS, E L, 1979. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against Escherichia coli. *Infection and Immunity*. 1979. Vol. 23, n° 2, pp. 522-531.

THOMAS, Robert James, KENFIELD, Stacey A et JIMENEZ, Alfonso, 2017. Exercise-induced biochemical changes and their potential influence on cancer: a scientific review. *British Journal of Sports Medicine*. avril 2017. Vol. 51, n° 8, pp. 640-644.

THORIN-TRESCASES, Nathalie, VOGHEL, Guillaume, FARHAT, Nada, DROUIN, Annick, GENDRON, Marie-Ève et THORIN, Éric, 2010. Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *médecine/sciences*. octobre 2010. Vol. 26, n° 10, pp. 875-880.

TIROSH, Oren et REZNICK, Abraham Z., 2000. Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier. pp. 89-114.

TISSIER, M., 2011. *Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin*. Vetagro-sup.

TRABER, M, 2000. Vitamine E. In : *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. pp. 359-371.

TSIKAS, Dimitrios, 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*. mai 2017. Vol. 524, pp. 13-30.

- VARGAS-MENDOZA, Nancy, MORALES-GONZÁLEZ, Ángel, MADRIGAL-SANTILLÁN, Eduardo Osiris, MADRIGAL-BUJADAR, Eduardo, ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, Isela, GARCÍA-MELO, Luis Fernando, ANGUIANO-ROBLEDO, Liliana, FREGOSO-AGUILAR, Tomás et MORALES-GONZALEZ, José A., 2019. Antioxidant and Adaptative Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. *Antioxidants*. 25 juin 2019. Vol. 8, n° 6, pp. 196.
- VEITH, Alex et MOORTHY, Bhagavatula, 2018. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology*. février 2018. Vol. 7, pp. 44-51.
- VIVIANO, K.R. et VANDERWIELEN, B., 2013. Effect of N-Acetylcysteine Supplementation on Intracellular Glutathione, Urine Isoprostanes, Clinical Score, and Survival in Hospitalized Ill Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. mars 2013. Vol. 27, n° 2, pp. 250-258.
- WAKSHLAG, Joseph J., STOKOL, Tracy, GESKE, Susan M., GREGER, Cara E., ANGLE, Craig T. et GILLETTE, Rob L., 2010. Evaluation of exercise-induced changes in concentrations of C-reactive protein and serum biochemical values in sled dogs completing a long-distance endurance race. *American Journal of Veterinary Research*. octobre 2010. Vol. 71, n° 10, pp. 1207-1213.
- WALTERS, John M., HACKETT, Timothy B., OGILVIE, Gregory K. et FETTMAN, Martin J., 2010. Polyunsaturated Fatty Acid Dietary Supplementation Induces Lipid Peroxidation in Normal Dogs. *Veterinary Medicine International*. 2010. Vol. 2010, pp. 1-4.
- WAMINE, 2020. Proteostress. *Wamine* [en ligne]. 2020. [Consulté le 3 septembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://www.wamine.fr/produits/proteostress/>
- WANDERS, Ronald J.A. et WATERHAM, Hans R., 2006. Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annual Review of Biochemistry*. juin 2006. Vol. 75, n° 1, pp. 295-332.
- WANG, Chunxin et YOULE, Richard J., 2009. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics*. décembre 2009. Vol. 43, n° 1, pp. 95-118.
- WAUTERS, J., PILLE, F., MARTENS, A., FRANCK, T., SERTEYN, D., GASTHUYS, F. et MEYER, E., 2013. Equine myeloperoxidase: A novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infectious joint disease in horses. *Equine Veterinary Journal*. mai 2013. Vol. 45, n° 3, pp. 278-283.
- WELCH, Hugh G. et STAINSBY, Wendell N., 1967. Oxygen debt in contracting dog skeletal muscle in situ. *Respiration Physiology*. octobre 1967. Vol. 3, n° 2, pp. 229-242.
- WENDEL, A, 1981. Glutathione peroxidase. In : *Methods in enzymologie*. pp. 325-333.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. Status of the health-related SDGs. In : *World Health statistics : 2018*. pp. 5-12.
- YAMAYA, Yoshiki, SUGIYA, Hiroshi et WATARI, Toshihiro, 2015. Methylation of free-floating deoxyribonucleic acid fragments in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with chronic bronchitis exposed to environmental tobacco smoke. *Irish Veterinary Journal*. décembre 2015. Vol. 68, n° 1, pp. 7.
- YARIBEYGI, H., PANAHI, Y., SAHRAEI, H., JOHNSTON, T.P. et SAHEBKAR, A., 2017. The impact of stress on body function : a review. . 21 juillet 2017.
- YOU, Yanghee, KIM, Kyungmi, YOON, Ho-Geun, LEE, Kwang-Won, LEE, Jeongmin, CHUN, Jiyeon, SHIN, Dong-Hoon, PARK, Jeongjin et JUN, Woojin, 2010. Chronic effect of ferulic acid from *Pseudosasa japonica* leaves on enhancing exercise activity in mice. *Phytotherapy Research*. 19 août 2010. Vol. 24, n° 10, pp. 1508-1513.

YUKON QUEST WEBSITE, 2013. The Modern Sled Dog. *Yukon Quest* [en ligne]. 3 octobre 2013. Disponible à l'adresse : <https://www.yukonquest.com/about/sled-dogs/modern-sled-dog>

ZINK, M. Christine et VAN DYKE, Janet B. (éd.), 2018. *Canine sports medicine and rehabilitation*. Second edition. Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-119-38038-2.

ZWART, Loeckie L De, MEERMAN, John H N, COMMANDEUR, Jan N M et VERMEULEN, Nico P E, 1998. BIOMARKERS OF FREE RADICAL DAMAGE APPLICATIONS IN EXPERIMENTAL ANIMALS AND IN HUMANS. *Free Radical Biology & Medicine*. 15 juillet 1998. Vol. 26, n° 1-2, pp. 202-226.



# Annexes

Présentation du protocole d'étude sur le sujet « étude du stress oxydant chez le chien de traîneau : utilisation du Porphyra Umbilicalis » et demande d'accord au protocole d'étude

Chers mushers,

Est présenté ci-dessous le protocole de l'étude Wamine à laquelle vous avez accepté de participer, ce dont nous vous remercions infiniment.

Le protocole se déroulera en 3 étapes :

- Les premières prises de sang se dérouleront le samedi 11 janvier (1<sup>er</sup> jour) sur un créneau d'environ 1 heure par attelage entre 7h30 et 14h. Ces prises de sang seront réalisées par 2 vétérinaires au niveau du cou de vos chiens et sans tonte. Nous nous engageons à minimiser au maximum le stress lié à notre intervention sur vos chiens. Une fois les prises de sang réalisées, nous vous donnerons les boîtes de médicaments nécessaires au bon déroulement du protocole.
- Administration des gélules pendant la course : Du samedi 11 janvier au dimanche 19 janvier, nous vous demanderons de donner 2 gélules le matin, 6 heures avant le départ de la course quand cela est possible, et 2 gélules le soir à chacun de vos chiens. Chaque chien aura sa boîte de médicaments avec son nom inscrit dessus (que nous vous donnerons le premier jour). La moitié de vos chiens aura le médicament Protéostress, et l'autre moitié aura un placebo, qu'il est tout aussi important de donner pour les besoins de l'étude. L'année dernière la plupart des chiens acceptaient de prendre les gélules en même temps que leur repas, mais nous pourrions en discuter ensemble le premier jour de la course.
- Les dernières prises de sang se dérouleront le dimanche 19 janvier (8<sup>ème</sup> jour) : Celles-ci pourront se dérouler avant la course pour les chiens qui ne courent pas ce jour-là, et après la course pour les autres (nous conviendront avec vous d'un horaire qui vous convient). Ces prises de sang seront également réalisées au niveau du cou et sans tonte.

*Annexe 1 : Document de présentation du protocole d'étude et de demande d'accord à destination des mushers (Peytoureau F., 2020)*

## Protocole prises de sang 11 et 19 janvier 2020

### Matériel :

- Porte-vacutainers + aiguilles vacutainer
- Pissettes d'alcool
- Tubes héparinés (4mL)
- Tubes EDTA (3mL)
- Micropipettes
- Lecteur lactate + bandelettes
- Tableau imprimé pour noter les lactates
- Glacière et blocs de glace

### Protocole :

1. Prise de sang : 4 mL tube hépariné, 3 mL tube EDTA
2. Remuer 5 fois lentement le tube EDTA
3. Analyse des lactates : Prélever 1 goutte de sang dans le tube hépariné avec la micropipette (bien refermer le tube de bandelettes entre chaque analyse car elles sont sensibles à l'humidité).
4. Remuer 5 fois lentement le tube hépariné
5. Mise au froid dans les glacières à la fin des PDS

### Utilisation du lecteur lactate :

-Si possible entre 5 et 25°C

-Calibrer le lecteur avec la bandelette test à chaque nouveau tube de bandelettes (attention de ne pas ranger cette bandelette avec les autres bandelettes, car cela pourrait les abimer)

-Il faut que « BL » soit affiché en dessous de « LAC » (BL pour sang total, et PL pour plasma → il est possible de passer de l'un à l'autre en appuyant sur la touche M).

-Bien nettoyer le lecteur entre chaque test (avec un peu d'alcool)

-Bien garder le lecteur à plat, sur une surface immobile.

*Annexe 2 : Document de présentation du protocole de prises de sang réalisées le 11 et 19 janvier 2020  
(Peytoureau F., 2020)*



**PEYTOUREAU Fanny**

**ETUDE DU STRESS OXYDATIF CHEZ LE CHIEN DE TRAINÉAU :  
UTILISATION DU PORPHYRA UMBILICALIS**

**Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, 8 Octobre 2020**

**RESUME** : Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production et l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène – abrégées ROS. Ces ROS ont de multiples rôles physiologiques dans l'organisme, comme celui de messenger cellulaire par exemple. En revanche, un excès de ROS dans la cellule peut mener à l'altération des biomolécules dont l'ADN, les protéines et les lipides. Ces altérations peuvent avoir des conséquences pathologiques à courts et à longs termes.

Or de nombreuses études, ont permis de montrer grâce à l'utilisation de méthodes variées permettant d'évaluer directement et indirectement le stress oxydatif, que l'effort intense réalisé par les chiens de traîneau était à l'origine d'un stress oxydatif. De multiples facteurs tels que l'augmentation de la consommation en oxygène, prédisposent les athlètes canins à voir leur défenses antioxydantes dépassées, et donc à développer un stress oxydatif.

Différents médicaments et compléments alimentaires ont déjà fait leur preuve en tant qu'antioxydants lors d'un exercice, et agissent en neutralisant directement les ROS ou en augmentant les défenses antioxydantes de l'organisme.

Dans ce cadre, il paraît important de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre le stress oxydatif chez le chien de traîneau. C'est pourquoi le laboratoire Wamine® et moi-même avons élaboré un protocole dans le but d'explorer l'activité antioxydante de l'algue rouge *Porphyra umbilicalis* chez le chien de traîneau en course de moyenne distance.

Si nous n'avons pas réussi à prouver son action antioxydante, nous avons vu que de multiples améliorations pouvaient être apportées à notre protocole afin de réaliser une étude plus informative.

**MOTS CLES :**

- Etude
- Chien
- Traîneau
- Stress oxydatif
- *Porphyra umbilicalis*

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur MION François  
1er Assesseur : Monsieur le Docteur THIEBAULT Jean-Jacques  
2ème Assesseur : Monsieur le Docteur LEFEBVRE Sébastien

**DATE DE SOUTENANCE : 8 Octobre 2020**