

INTERÊT DE LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS DANS L'ALIMENTATION DES CARNIVORES DOMESTIQUES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Justine, Odile, Carole PASTRE

Née, le 25 février 1981 à TOULOUSE (Haute-Garonne)

Directeur de thèse : Mme le Docteur Nathalie PRIYMENKO

JURY

PRESIDENT :

M. Jean-Paul THOUVENOT

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :

Mme Nathalie PRIYMENKO

M. Patrick VERWAERDE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Toulouse, 2005

NOM: PASTRE

PRENOM: JUSTINE

TITRE: INTERET DE LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS DANS L'ALIMENTATION DES CARNIVORES DOMESTIQUES

RESUME:

Pour renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme et prévenir l'apparition de lésions dues à l'oxydation, les chercheurs se sont interrogés sur l'utilité de différentes molécules antioxydantes en supplémentation dans l'alimentation, telles les vitamines E et C, les caroténoïdes, la taurine et quelques minéraux et oligo-éléments (sélénium, magnésium, zinc, manganèse). L'étude bibliographique des travaux réalisés chez l'homme et chez les carnivores domestiques a montré que l'emploi de certaines molécules semble justifié lorsque des mécanismes radicalaires sont impliqués tels que l'effort physique intense, la réaction immunitaire, le vieillissement et lors de maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives, oculaires ou ostéoarticulaires. Néanmoins, même si actuellement l'ajout d'antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques suscite un formidable engouement, il reste encore beaucoup de problèmes à élucider avant de garantir leur efficacité et leur innocuité.

MOTS-CLES: CARNIVORE DOMESTIQUE / CHIEN / CHAT / ANTIOXYDANT / RADICAUX LIBRES / STRESS OXYDATIF / SUPPLEMENTATION / ALIMENTATION

ENGLISH TITLE: INTEREST OF ANTIOXIDANTS SUPPLEMENTATION IN DOMESTIC CARNIVORES DIET

ABSTRACT:

To intensify system antioxidant defences and prevent apparition of lesions due to oxidation, scientists investigated usefulness of supplementation with antioxidant molecules in diet, such as vitamin E, C, carotenoïds, taurine and a few trace elements (selenium, magnesium, zinc, manganese). The bibliographic study of works on domestic carnivores, shows that the use of these molecules seems to be justified when oxidative mechanisms such as intensive physical effort, immune reactions, ageing, cancer, as well as neurodegenerating, ocular and osteoarticular diseases are implied. Nevertheless, currently, even if addition of antioxidants in domestic carnivores diet is trendy and full of hope, many problems must be sorted out before their efficiency and harmlessness are assured.

KEY WORDS: DOMESTIC CARNIVORE / DOG / CAT / ANTIOXIDANT / RADICAL OXYGEN SPECIES / OXIDATIVE STRESS / SUPPLEMENTATION / NUTRITION

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

| | | |
|-----------------------------|------|-------------------------|
| Directeur | : M. | P. DESNOYERS |
| Directeurs honoraires..... | : M. | R. FLORIO |
| | M. | J. FERNEY |
| | M. | G. VAN HAVERBEKE |
| Professeurs honoraires..... | : M. | A. BRIZARD |
| | M. | L. FALIU |
| | M. | C. LABIE |
| | M. | C. PAVAU |
| | M. | F. LESCURE |
| | M. | A. RICO |
| | M. | A. CAZIEUX |
| | Mme | V. BURGAT |
| | M. | D. GRIESS |
| | M. | J. CHANTAL |
| | M. | J.-F. GUELF |
| | M. | M. ECKHOUTTE |

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy-Pierre**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

PROFESSEURS 2^e CLASSE

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MARENDI Marc, *Pathologie de la reproduction*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Paul THOUVENOT

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Nutrition

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommage respectueux.

A notre jury de thèse

Madame le Docteur Nathalie PRIYMENKO

Maître de Conférences l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Alimentation

Qui nous a inspiré ce sujet, nous a guidé tout en nous laissant une grande autonomie dans cette étude,

Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

Monsieur le Docteur Patrick VERWAERDE

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Anesthésie - Réanimation

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Toute notre gratitude.

A mes parents, Philippe et Isabelle,

Pour leur amour et leur soutien qui m'ont tant aidé durant toutes mes années d'études et dans tous les moments qui accompagnent ma vie

A ma petite sœur, Anne-Camille,

Pour avoir été à mes côtés et aux côtés de mes parents à chaque instant, bon comme mauvais, de mon existence.

A Sébastien,

Pour son soutien de tous les jours.

A Guillaume et Corinne,

Pour leur aide précieuse et leur conseil dans la réalisation de notre travail. Un grand merci.

A Cécile, Aurélie, Christine.

A Arnaud, Fabrice, Nicolas, Eric, Jérôme, Olivier.

A mes amis.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| TABLE DES FIGURES..... | 7 |
| TABLEAUX | 9 |
| TABLE DES ABREVIATIONS..... | 10 |
| INTRODUCTION..... | 12 |
| PARTIE I : PRESENTATION DES ANTIOXYDANTS | 13 |
| 1. Les radicaux libres | 13 |
| 1.1. Définition | 13 |
| 1.2. Nature des radicaux libres..... | 13 |
| 1.2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène : | 13 |
| 1.2.1.1. Ion superoxyde : $O_2^{\circ-}$ | 13 |
| 1.2.1.2. Radical libre hydroxyle : OH° | 13 |
| 1.2.1.3. L'oxygène singulet : 1O_2 | 14 |
| 1.2.1.4. Le radical peroxyde: H_2O_2 | 14 |
| 1.2.2. Les espèces libres non oxygénées | 14 |
| 1.3. Production de radicaux libres..... | 14 |
| 1.4. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme | 15 |
| 1.4.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire..... | 15 |
| 1.4.1.1. Rôle dans la phagocytose..... | 15 |
| 1.4.1.2. Rôle dans la communication cellulaire | 16 |
| 1.4.2. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres..... | 18 |
| 1.4.2.1. Les protéines..... | 18 |
| 1.4.2.2. Les glucides | 18 |
| 1.4.2.3. Les lipides..... | 18 |
| 1.4.2.4. L'ADN..... | 19 |
| 2. Les systèmes de défense et le stress oxydatif..... | 19 |
| 2.1. Les systèmes antioxydants | 19 |
| 2.1.1. Modes d'action des antioxydants | 19 |
| 2.1.2. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants | 20 |
| 2.1.3. Origines des antioxydants..... | 21 |
| 2.2. Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif..... | 22 |
| 3. Les molécules utilisables en supplémentation..... | 22 |
| 3.1. Vitamine E | 22 |
| 3.1.1. La vitamine E interrompt la phase de propagation de la réaction de peroxydation lipidique... 23 | |
| 3.1.2. Les tocophérols piègent l'oxygène singulet | 23 |
| 3.1.3. Métabolisme de l'acide arachidonique | 23 |
| 3.2. Vitamine C | 24 |
| 3.3. Caroténoïdes..... | 25 |
| 3.4. Polyphénols et flavonoïdes..... | 26 |
| 3.5. Taurine | 26 |
| 3.6. Oligo-éléments | 27 |
| 3.7. Minéraux | 28 |
| PARTIE II : ROLE DES ANTIOXYDANTS..... | 29 |
| 1. Rôle des antioxydants chez l'animal sportif..... | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.1. | Mécanismes de la production de ROS dans le muscle soumis à un effort | 29 |
| 1.2. | Conséquences de la présence des radicaux libres oxygénés dans le muscle | 31 |
| 1.2.1. | Action sur les lipides | 31 |
| 1.2.2. | Modifications sur l'ADN | 32 |
| 1.3. | Evolution du statut antioxydant du muscle après un effort | 33 |
| 1.3.1. | Molécules à activité antioxydantes enzymatiques | 33 |
| 1.3.2. | Molécules à activité antioxydantes non enzymatiques | 33 |
| 1.3.3. | Molécules qui piègent les ions | 34 |
| 1.3.4. | Mesure du statut antioxydant total du plasma | 34 |
| 1.4. | Une supplémentation en antioxydant serait-elle utile et bénéfique ? | 35 |
| 1.4.1. | Un modèle d'étude : le chien sportif | 35 |
| 1.4.2. | Les données des expériences de supplémentation | 35 |
| 1.4.2.1. | Aptitude de la supplémentation à prévenir les dommages causés par les radicaux libres | 35 |
| 1.4.2.2. | Aptitude de la supplémentation à renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme | 36 |
| 1.4.2.3. | Effet de la supplémentation sur les performances | 37 |
| 1.5. | Quelques points méritent réflexion | 38 |
| 1.5.1. | Correction des concentrations plasmatiques en antioxydants | 38 |
| 1.5.2. | Nature de l'exercice auquel sont soumis les chiens | 38 |
| 2. | Rôle des antioxydants dans le système immunitaire | 42 |
| 2.1. | Effet de la supplémentation en antioxydants sur le système immunitaire | 42 |
| 2.1.1. | Le cas du chien | 42 |
| 2.1.1.1. | Influence de la supplémentation sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire | 42 |
| 2.1.1.1.1. | Hyper Sensibilité Retarde | 42 |
| 2.1.1.1.2. | Population de cellules mononuclées sanguines périphériques | 43 |
| 2.1.1.1.3. | Population des lymphocytes T | 43 |
| 2.1.1.2. | Influence de la supplémentation sur la réponse immunitaire à médiation humorale | 43 |
| 2.1.1.3. | Influence de la supplémentation sur la sécrétion de cytokines | 44 |
| 2.1.2. | Le cas du chat | 45 |
| 2.2. | Comment les antioxydants pourraient-ils agir sur la réponse immunitaire ? | 46 |
| 2.2.1. | Hypothèse I | 46 |
| 2.2.2. | Hypothèse II | 47 |
| 2.2.3. | Hypothèse III | 48 |
| 2.3. | Intérêts de la supplémentation pour la santé animale | 48 |
| 2.3.1. | Application à la vaccination : renforcer la RIMH grâce à la supplémentation | 49 |
| 2.3.2. | Application chez les chiots et les chatons : optimiser la primo-vaccination | 50 |
| 2.3.3. | Application à l'animal âgé : ralentir le déclin de la réponse immunitaire liée à l'âge | 51 |
| 2.3.3.1. | Les conséquences du vieillissement sur la fonction immunitaire | 51 |
| 2.3.3.2. | Justification de l'intérêt de la supplémentation de l'animal âgé | 52 |
| 2.3.4. | Application à l'animal sportif | 54 |
| 3. | Rôle des antioxydants dans différentes pathologies | 55 |
| 3.1. | Rôle des radicaux libres dans certaines maladies liées au vieillissement | 55 |
| 3.1.1. | Théorie radicalaire du vieillissement et rôle des mitochondries | 55 |
| 3.2. | Rôle des antioxydants dans les maladies neurodégénératives | 56 |
| 3.2.1. | Comment agiraient les antioxydants dans le cerveau ? | 56 |
| 3.2.2. | Expériences de supplémentation | 57 |
| 3.3. | Rôle des antioxydants dans les maladies oculaires : la cataracte | 58 |
| 3.4. | Rôle des antioxydants dans les pathologies ostéo-articulaires | 59 |
| 3.4.1. | Production de radicaux libres dans les os | 59 |
| 3.4.1.1. | Production d'oxyde nitrique par les cellules de l'articulation | 59 |
| 3.4.1.2. | Production de radicaux libres par les ostéoclastes | 62 |
| 3.4.1.3. | Production de radicaux libres lors des processus inflammatoires | 62 |
| 3.4.2. | Expériences de supplémentation | 62 |
| 3.4.3. | Mécanismes d'action des antioxydants | 63 |
| 3.5. | Rôle des antioxydants dans les maladies cardiovasculaires | 64 |
| 3.5.1. | Implications du stress oxydatif | 64 |
| 3.5.2. | Le statut antioxydant de l'animal est modifié en présence de troubles cardiaques | 65 |
| 3.5.3. | Effets de la supplémentation | 66 |
| 3.6. | Le rôle des antioxydants dans les maladies chroniques : exemple du cancer | 68 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.6.1. | Arguments en faveur de l'utilisation des antioxydants..... | 69 |
| 3.6.1.1. | Protection vis à vis des lésions sur l'ADN..... | 69 |
| 3.6.1.2. | Action sur l'immunité anti-cancéreuse..... | 70 |
| 3.6.1.3. | Action sur le contrôle de la prolifération et la mort cellulaire par leur intervention dans la communication cellulaire..... | 71 |
| 3.6.2. | Arguments en défaveur..... | 71 |
| 3.6.2.1. | Intérêt des radicaux libres dans l'élimination des cellules cancéreuses..... | 71 |
| 3.6.2.2. | Variations des effets des antioxydants en fonction du stade de développement du cancer.. | 71 |
| 3.6.2.3. | Variations des effets des antioxydants en fonction du type de cancer..... | 72 |
| 3.6.2.4. | Effet négatif de l'utilisation des antioxydants : l'exemple du cancer du poumon dans une population de fumeurs..... | 72 |
| 3.6.2.5. | Traitement anti-cancéreux..... | 73 |
| 3.7. | Rôle des antioxydants dans le diabète de type I et la prévention de la formation de corps de Heinz chez le chat | 74 |

PARTIE III : DISCUSSION DES TRAVAUX D'ETUDE SUR L'INTERET DE LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS..... 77

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Méthodes d'études..... | 77 |
| 1.1. | Etude d'observation..... | 77 |
| 1.1.1. | Les études sur échantillon de population..... | 77 |
| 1.1.2. | Les études cas témoins..... | 78 |
| 1.1.3. | Les études prospectives..... | 79 |
| 1.2. | Les études d'intervention..... | 79 |
| 2. | Méthodes de mesures..... | 80 |
| 2.1. | Mesures des produits des réactions oxydatives..... | 80 |
| 2.1.1. | Les lésions sur l'ADN..... | 80 |
| 2.1.2. | Les lésions sur les lipides..... | 81 |
| 2.2. | Les mesures des défenses contre les radicaux libres..... | 82 |
| 2.2.1. | Mesures de l'activité des enzymes antioxydantes..... | 82 |
| 2.2.2. | Mesures des antioxydants non enzymatiques..... | 83 |
| 2.2.3. | Mesures des concentrations des enzymes piégeant les métaux de transition..... | 84 |
| 2.2.4. | Mesures du statut antioxydant total (TAS)..... | 84 |
| 2.2.5. | Mesure de l'oxydation des lipoprotéines de faibles densité (LDL)..... | 86 |
| 3. | Facteurs à prendre en compte dans l'étude de la supplémentation..... | 86 |
| 3.1. | Effet de la race..... | 86 |
| 3.2. | Effet de l'âge..... | 87 |
| 3.2.1. | Variation du statut antioxydant en fonction de l'âge..... | 87 |
| 3.2.2. | Les besoins des jeunes animaux..... | 87 |
| 3.2.3. | Les effets de la supplémentation sont différents entre l'animal âgé et le plus jeune..... | 88 |
| 3.3. | Effet du sexe..... | 89 |

PARTIE IV : ETABLIR UN PROGRAMME DE SUPPLEMENTATION..... 90

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Devenir des antioxydants dans l'organisme..... | 90 |
| 1.1. | Les carnivores domestiques peuvent-ils absorber les antioxydants ?..... | 90 |
| 1.1.1. | Les caroténoïdes..... | 90 |
| 1.1.1.1. | Les caractéristiques d'absorption du β -carotène sont différentes en fonction de l'espèce... | 90 |
| 1.1.1.2. | Cas particuliers des individus ne répondant pas à la supplémentation en β -carotène..... | 92 |
| 1.1.2. | Le problème de la vitamine C..... | 94 |
| 1.2. | Les carnivores domestiques peuvent-ils concentrer efficacement les antioxydants dans les tissus et les cellules ?..... | 94 |
| 2. | Dose utilisable en supplémentation..... | 95 |
| 2.1. | Dose et durée de la supplémentation..... | 96 |
| 2.2. | Variabilités des effets en fonction de la dose..... | 98 |
| 2.3. | Forme galénique..... | 98 |

| | |
|--|------------|
| 3. Toxicité des antioxydants | 99 |
| 3.1. Vitamine C | 99 |
| 3.1.1. Action sur l'acidose métabolique après un effort | 99 |
| 3.1.2. Risque de calcul..... | 100 |
| 3.2. Vitamine E | 100 |
| 3.2.1. Effet antivitamine K | 100 |
| 3.3. Effet pro-oxydants à fortes doses | 100 |
| 3.3.1. Vitamine E..... | 100 |
| 3.3.1.1. Expérience de supplémentation | 100 |
| 3.3.1.2. Effets pro-oxydants..... | 100 |
| 3.3.1.3. Effets co-pro-oxydants..... | 101 |
| 3.3.2. Vitamine C | 101 |
| 3.3.2.1. Expérience de supplémentation | 101 |
| 3.3.2.2. Action sur les métaux | 102 |
| | |
| 4. Action combinée des antioxydants ou supplémentation simple | 102 |
| 4.1. Les problèmes de compétition pour l'absorption intestinale..... | 102 |
| 4.2. L'effet d'économie..... | 103 |
| 4.3. L'action synergique..... | 103 |
| | |
| 5. Pratique de la supplémentation | 105 |
| 5.1. Mode de supplémentation | 105 |
| 5.2. Les aliments disponibles dans le commerce..... | 106 |
| 5.3. Formulation des antioxydants dans l'aliment..... | 107 |
| | |
| CONCLUSION..... | 109 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 110 |

TABLE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie. | 16 |
| Figure 2. Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire | 17 |
| Figure 3. Mécanismes de la peroxydation lipidique | 18 |
| Figure 4. Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (d'après OPARA, 2002). | 21 |
| Figure 5. Structure des composés à action vitaminique E. | 23 |
| Figure 6. Action antioxydante de la vitamine E: interruption de la phase de propagation. | 23 |
| Figure 7. Effets des radicaux libres et de la vitamine E sur le métabolisme de l'acide carotène. | 24 |
| Figure 8. Réactions d'oxydoréduction faisant intervenir les différentes formes de la vitamine C. | 24 |
| Figure 9. Activité principale des polyphénols : le piégeage de radicaux libres. | 26 |
| Figure 10. Structure de la taurine. | 26 |
| Figure 11. Mécanismes de production de radicaux libres pendant un exercice (d'après HINCHCLIFF, 2000). | 30 |
| Figure 12. Activité moyenne de la créatine kinase sérique (graphique du haut) et de la concentration plasmatique en isoprostanes (graphique du bas) de deux groupes de chiens de traîneaux (d'après HINCHCLIFF, 2000). | 31 |
| Figure 13. Concentrations plasmatiques moyennes en 7,8 dihydro-8-2' deoxyguanosine (8-oxodG) dans un groupe de chiens sédentaires et un groupe de chiens pratiquant un effort physique (d'après BASKIN, 2000). | 32 |
| Figure 14. Concentration plasmatique moyenne de vitamine E rapporté à la concentration sérique de cholestérol de deux groupes de chiens de traîneaux (d'après HINCHCLIFF, 2000). | 33 |
| Figure 15. Evolution de la concentration plasmatique en Ig G de chiens nourris quotidiennement (depuis S0) avec 0, 5, 10, 20 mg de lutéine, de la semaine 13 à 17 de la période d'enrichissement (d'après KIM et al., 2000). | 44 |
| Figure 16. Concentration de NaCl pour laquelle 50% des érythrocytes de deux populations de chats (Antioxydant et Standard) sont lysés (d'après HARPER, 2001). | 47 |
| Figure 17. Rôle immunomodulateur de la vitamine E. Elle inhibe la production de PGE2 à partir de l'arachidonate. Ces PGE2 sont impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire. | 48 |
| Figure 18. Titre anticorps en calicivirus félin après la vaccination annuelle de trois groupes de chats nourris avec un régime A, B et C (d'après HARPER et al., 2001). | 49 |
| Figure 19. Evolution de la réponse en anticorps aux vaccins contre un adénovirus et un parvovirus chez des chiots supplémentés et non supplémentés (d'après SMITH et al., 2000). | 50 |
| Figure 20. Evolution du titre en anticorps anti-herpès virus félin de deux groupes de chatons, l'un supplémenté, l'autre nourri avec un régime standard (d'après KOELSCH et al., 2001). | 50 |
| Figure 21. Evolution du titre en anticorps dirigé contre le virus de la panleucopénie de deux groupes de chatons, l'un supplémenté, l'autre nourri avec un régime standard (d'après KOELSCH et al., 2001). | 51 |
| Figure 22. Comparaison des titres anticorps anti-adénovirus de deux groupes de chiens, après 6 mois d'un programme de supplémentation alimentaire (d'après DEVLIN et al., 2000, b). | 53 |
| Figure 23. Le stress oxydatif et les protéines AB dans les phénomènes de mort neuronale (d'après COTMAN et al., 2002). | 57 |
| Figure 24. Rôle du NO dans l'apparition et l'entretien des lésions oxydatives au niveau osseux. | 61 |
| Figure 25. Effets de l'addition de graisses oxydées dans l'alimentation de chiots Coonhounds sur deux paramètres de la croissance osseuse. La figure de gauche montre une diminution du volume d'os trabéculaire. La figure de droite illustre la diminution de la croissance de l'os trabéculaire (d'après WATKINS, 2000). | 62 |
| Figure 26. Effets de la vitamine E sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (d'après WATKINS, 2000). | 64 |
| Figure 27. Principales étapes de la carcinogenèse et intervention des radicaux oxygénés (figurées par un rond noir) (d'après LE MOEL et al., 1998). | 68 |
| Figure 28. Lésions endogènes et exogènes subit par l'ADN, mesurées par « Comet assay », dans un groupe de chiens supplémentés avec un mélange de vitamine C, de vitamine E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène, deux mois après supplémentation. Les résultats exprimés sont des valeurs moyennes, n=20, les différences sont significatives à P<0.005. Les valeurs de départ étaient similaires dans les deux groupes (d'après HEATON et al., 2002). | 70 |
| Figure 29. Courbe d'absorption du β -carotène après administration orale unique par le chat (d'après CHEW, 2000, b). | 91 |
| Figure 30. Courbe d'absorption du β -carotène après administration orale, chez le chien (d'après CHEW, 2000, c). | 91 |
| Figure 31. Concentration plasmatique en β -carotène chez des chiens supplémentés quotidiennement avec 0, 12.5, 25, 50 ou 100 mg de β -carotène pendant 7 jours (d'après CHEW, 2000, c). | 97 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 32. Concentrations plasmatiques en β-carotène de chiens supplémentés avec 0, 2, 20 ou 50 mg de β-carotène pendant 8 semaines (d'après CHEW, 2000, c).</i> | 97 |
| <i>Figure 33. Action synergique des principaux antioxydants</i> | 104 |

TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| <i>Tableau 1. Principales sources de production des radicaux libres.</i> | 15 |
| <i>Tableau 2. Principaux modes d'action de quelques antioxydants</i> | 20 |
| <i>Tableau 3. Les deux types de protection antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.</i> | 21 |
| <i>Tableau 4. Structure des principaux caroténoïdes (d'après LE MOEL, 1998)</i> | 25 |
| <i>Tableau 5. Actions possibles du zinc comme antioxydant (d'après DI SILVESTRO, 2000).</i> | 27 |
| <i>Tableau 6. Comparaison de huit protocoles expérimentaux étudiant les effets de la supplémentation en antioxydants sur des chiens soumis à un effort physique, classé selon la nature et la dose d'antioxydants administrés (vitamine C, E, β-carotène, lutéine et zinc), la durée de la période de supplémentation et le type d'exercice.</i> | 39 |
| <i>Tableau 7. Influence de la supplémentation alimentaire en antioxydants selon huit protocoles d'enrichissement définis au tableau 6 sur différents marqueurs du stress oxydatif.</i> | 40 |
| <i>Tableau 8. Effet de la supplémentation avec des doses de 0, 10, 15 mg de lutéine d'un échantillon de 56 chats âgés de 10 mois, pendant 12 semaines, sur différents paramètres de la réponse immunitaire.</i> | 45 |
| <i>Tableau 9. Effets de doses variées de β-carotène et de rétinol sur la tumorigenèse de certains modèles animaux (d'après MOON, 1989).</i> | 72 |
| <i>Tableau 10. Comparaison des concentrations en acide ascorbique, α-tocophérol et β-carotène dans deux échantillons de chiens (d'après SNOW et al., 1990).</i> | 77 |
| <i>Tableau 11. Comparaisons de l'absorption et de la réponse immunitaire du β-carotène chez les « low-responders » (LR) et « responders » (R) chez des chiens nourris avec 20 et 50 mg de β-carotène par jour, pendant 8 semaines (d'après CHEW, 2000, c).</i> | 93 |
| <i>Tableau 12. Apports recommandés chez les carnivores domestiques en quelques vitamines et oligo-éléments (d'après BSAVA, 1996).</i> | 96 |
| <i>Tableau 13. Influence de l'augmentation de la concentration en sélénium sur la diminution de la viabilité de cellules tumorales en cultures (d'après FICO et al., 1986).</i> | 98 |
| <i>Tableau 14. Analyses moyennes de la teneur en nutriments à activité antioxydante dans quelques aliments pour chiens (d'après les données commerciales).</i> | 106 |
| <i>Tableau 15. Analyses moyennes de la teneur en nutriments à activité antioxydante dans quelques aliments pour chats (d'après les données commerciales).</i> | 106 |
| <i>Tableau 16. Principaux facteurs affectant la stabilité de quelques antioxydants</i> | 107 |

TABLE DES ABREVIATIONS

AAFCO : « Association of American Feed Control Officials »
AB : protéine dite β -amyloïde
ABTS: 2-, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolne-6-sulfonate)
AGI : Acide Gras Insaturé
AGPI : acide gras polyinsaturé
AGS : Acide Gras Saturé
APP : « Acute Phase Proteins » : Protéine de la phase aiguë de l'inflammation
BC : β -carotène
CAT : catalase
CK : Créatine Kinase
Con A : Concanavalin A
DC: Diènes Conjugués
ESR: Electron Spin Trapping
FC : Chromolipides Fluorescents
FRAP: ferric reducing ability assay
GSH : glutathion
GPx : Glutathion peroxydase
HSR : hypersensibilité retardé
Ig : immunoglobulines G
IL2 : interleukine 2
KCN: cyanure de potassium
LDL: lipoprotéines de faible densité
LR : « Low Responders »
MA : Maladie d'Alzheimer
MDA : malondialdehyde
NK: Natural Killer
NO : oxyde nitrique
NOS: NO synthetase
NRC: National Research Council's
OH° : radical hydroxyle
ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity
PARS : poly-ADP-ribose
PGE2 : Prostaglandines E2
PHA : phytohémagglutinine
PWM : pokeweed mitogen
TAS: Statut Antioxydant Total
TBA : acide thiobarbiturique
TBARM : utilisation du matériel réactif à l'acide thiobarbiturique
TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
RIMC : Réaction Immunitaire à Médiation Cellulaire
RIMH : Réaction Immunitaire à Médiation Humorale
RL: Radicaux Libres
ROS : espèce réactive dérivée de l'oxygène
S : semaine:
SOD : superoxyde dismutase

VLDL: lipoprotéine de très faible densité
8-oxodG: 7, 8 dihydro-8-2' deoxyguanosine

INTRODUCTION

Mettre en évidence un lien entre l'occurrence de certaines maladies et l'alimentation est un domaine d'étude qui retient l'attention de nombreux chercheurs. Certes, l'origine de la plupart des états pathologiques est multifactorielle, mais la possibilité d'influencer leur apparition et leur développement grâce à l'alimentation présente un grand intérêt. L'utilité de certains nutriments semble aujourd'hui reconnue. Il s'agit, en particulier de vitamines et oligo-éléments ayant une activité antioxydante, permettant de lutter contre les radicaux libres. A cause de la grande réactivité et de l'action délétère de ces derniers sur les systèmes biologiques, ils sont incriminés dans les mécanismes du vieillissement et interviennent dans la physiopathologie de plus d'une centaine de maladies. Renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme semble donc un enjeu majeur pour préserver la santé.

Comme l'illustre la multiplicité des publications, ce domaine d'étude est en plein essor. De plus en plus d'arguments plaident en faveur de l'utilisation de compléments vitaminiques et minéraux. Les études épidémiologiques et les essais de supplémentation chez l'homme mettent en évidence une corrélation entre leur emploi et une occurrence moindre de différentes maladies comme le cancer, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, oculaires, neurodégénératives... Chez les animaux domestiques, l'ajout de molécules antioxydantes à hautes doses dans l'alimentation devient une pratique de plus en plus courante. Comme il est possible de le lire sur de nombreuses étiquettes d'aliments composés, leur emploi devient aussi un véritable argument de vente. Les grands fabricants d'aliments vantent leurs effets bénéfiques, encouragent leur utilisation et investissent dans la recherche sur ce sujet.

La question est de savoir s'il est possible d'appliquer aux carnivores domestiques ce qui est à peine élucidé chez l'homme. Les chiens et les chats sont-ils sensibles à l'administration par voie orale de ces molécules? Leurs défenses antioxydantes peuvent-elles réellement être renforcées par une alimentation complète et équilibrée, contenant des antioxydants? Des effets bénéfiques pour la santé peuvent-ils être retirés de leur administration à des doses dites thérapeutiques?

Nous nous proposons de faire le bilan des expériences réalisées chez les carnivores domestiques, en nous limitant aux espèces canine et féline. Notre étude s'intéressera particulièrement aux vitamines E et C, aux caroténoïdes, à la taurine, aux minéraux et aux oligo-éléments (sélénium, zinc, manganèse).

Nous présenterons les différentes molécules utilisées en supplémentation et leurs effets dans la lutte contre les radicaux libres. Puis, à partir de différentes maladies du chien et du chat, nous nous intéresserons à leur impact sur la santé. Nous discuterons des méthodes utilisées afin de nuancer les conclusions expérimentales. Enfin, nous soulignerons les points dont il faut tenir compte pour réaliser et adapter au mieux un programme rationnel de supplémentation.

PARTIE I : PRESENTATION DES ANTIOXYDANTS

1. Les radicaux libres

1.1. Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Comme notre étude concerne les systèmes biologiques, nous allons nous intéresser essentiellement aux molécules dérivées de l'oxygène.

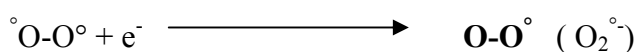
1.2. Nature des radicaux libres

1.2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène :

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons radicalaires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme. Les mitochondries utilisent la plus grosse part de l'oxygène inspiré pour la production d'énergie. Cependant 3 à 5% de cet oxygène utilisé par les mitochondries lors de l'activité métabolique normale est inévitablement à l'origine de radicaux libres oxygénés, hautement toxiques.

1.2.1.1. Ion superoxyde : O_2°

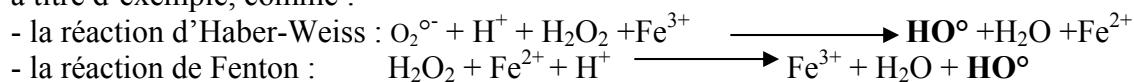
L'ion superoxyde (O_2°) est un dérivé très réactif de l'oxygène. Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante.



Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

1.2.1.2. Radical libre hydroxyle : OH°

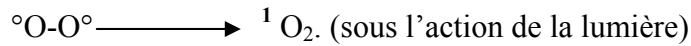
Le radical libre hydroxyle (OH°) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10^{-6} secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :



1.2.1.3.

L'oxygène singulet : $^1 O_2$

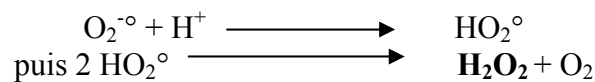
Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



1.2.1.4.

Le radical peroxyde: H_2O_2

Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ROS) même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



1.2.2.

Les espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ROS. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ROS générant des molécules réactives et nocives.

1.3. **Production de radicaux libres**

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d' O_2 pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés.

Les autres sources de production de radicaux libres sont représentées dans le tableau 1. Elles sont classées en deux catégories :

- les sources endogènes : les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme,
- les sources exogènes : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme.

Tableau 1. Principales sources de production des radicaux libres.

| | |
|-------------------|---|
| Sources endogènes | Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries) Cellules phagocytaires Métabolisme de l'acide arachidonique Système xanthine/Xanthine oxydase |
| Sources exogènes | Rayonnement électromagnétique Métaux de transition Pesticides Médicaments... |

1.4. Conséquences de la présence des radicaux libres dans l'organisme

1.4.1. Intérêts des radicaux libres dans la physiologie cellulaire

1.4.1.1. Rôle dans la phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries. Après sa phagocytose par un macrophage, une bactérie se retrouve dans une vésicule appelée phagosome. Celui-ci va fusionner avec un lysosome pour donner un phago-lysosome. Alors, une succession de réactions appelées « explosion respiratoire » a lieu. Son but est de générer des oxydants bactéricides (H_2O_2 , O_2° , $^{\circ}OH$, NO) (Figure 1).

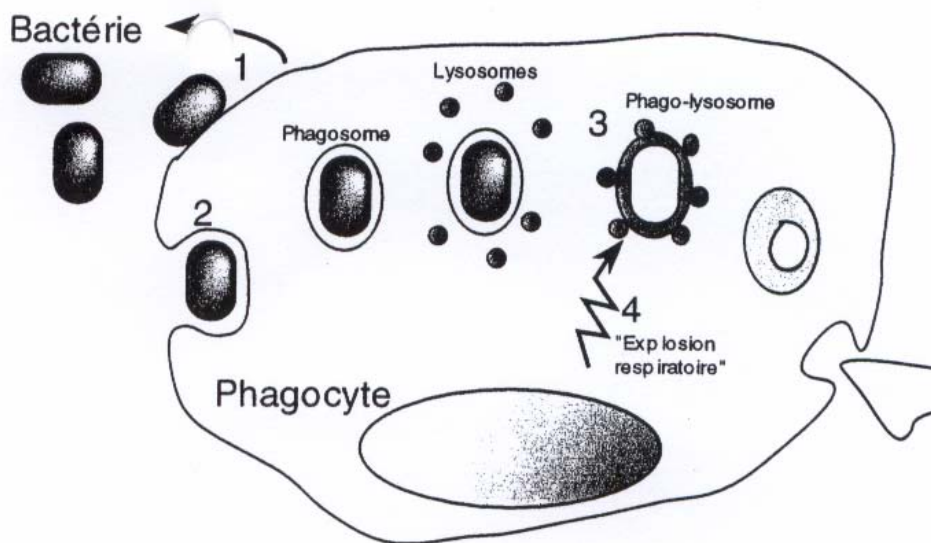


Figure 1. Production de radicaux libres lors de la phagocytose d'une bactérie.

Légende : 1. Chimiotactisme et adhésion. 2. Ingestion. 3. Fusion phagosome-phagolysosome. 4. L' « explosion respiratoire » génère dans le phagolysosome des oxydants bactéricides (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$, HO^{\cdot}).

1.4.1.2. Rôle dans la communication cellulaire

Les ROS peuvent agir en tant que « molécule-signal » et ainsi intervenir dans la communication intracellulaire et intercellulaire. Ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire.

Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les radicaux libres ne sont pas encore élucidés. Les principes généraux sont présentés sur la figure 2. En résumé :

- les radicaux libres joueraient un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants.
- les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire.
- les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messenger intracellulaire. La fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse de ROS.

Les antioxydants pourraient intervenir dans ces mécanismes et moduler la transmission du signal et l'expression des gènes. Par exemple, en piégeant les radicaux libres, ils coupent court à toute la chaîne de réactions qui conduisait à l'activation de gènes. Or, les messages cellulaires faisant intervenir les ROS sont impliqués, en particulier, dans les phénomènes de croissance cellulaire, d'apoptose et, éventuellement, dans les phénomènes de cancérogenèse. Les antioxydants, en bloquant ces types de messages, pourraient influencer la multiplication cellulaire. De plus amples recherches sont nécessaires avant de savoir si l'utilisation des antioxydants peut être bénéfique.

De plus, ce type de communication cellulaire semble faire intervenir des mécanismes spécifiques. N'importe quel antioxydant n'est donc pas capable de modifier ces réactions. C'est pourquoi il faut déjà bien comprendre les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir les ROS, pour voir s'il est, à la fois, possible et bénéfique de les modifier avec des antioxydants.

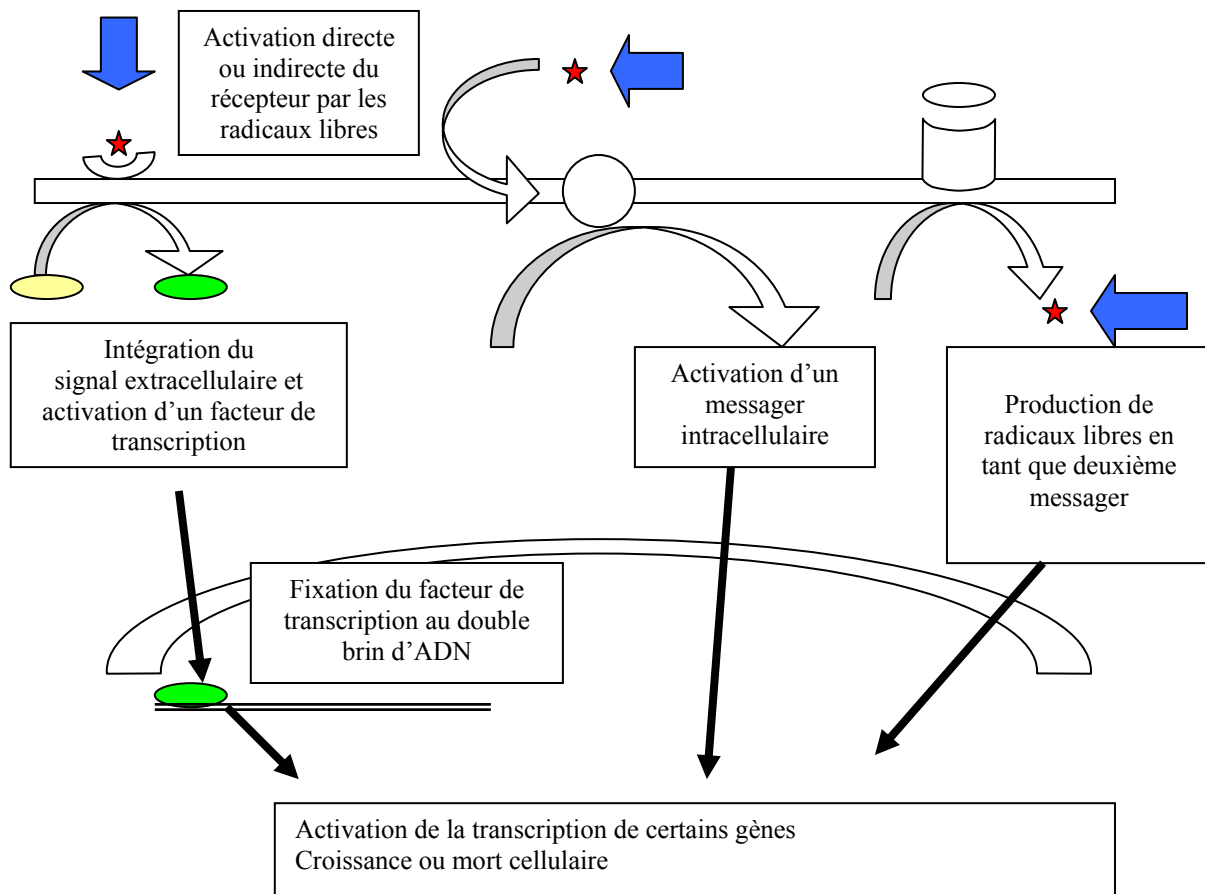
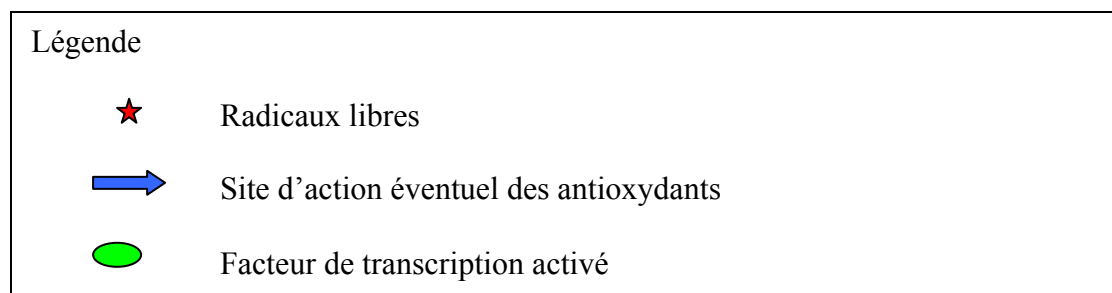


Figure 2. Rôle des radicaux libres dans la communication cellulaire



1.4.2. Les lésions cellulaires associées aux radicaux libres

Les radicaux libres sont instables et cherchent à s'apparier avec un électron d'une autre molécule. Ils sont à l'origine de réactions en chaîne qui conduisent à des destructions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN, les membranes cellulaires mais aussi toutes les molécules pouvant être déstabilisées.

1.4.2.1. Les protéines

Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. C'est donc toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée.

1.4.2.2. Les glucides

Les radicaux libres peuvent aussi agir sur le glucose et générer des intermédiaires réactifs. Les dommages oxydatifs peuvent alors se propager via l'attaque des radicaux formés sur d'autres molécules.

1.4.2.3. Les lipides

Les radicaux libres peuvent attaquer les lipides et notamment les acides gras mono- et polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Ils sont à l'origine de réaction de peroxydation (Figure 3). Il s'agit d'une succession de réactions radicalaires à l'origine de la libération de molécules réactives. En l'absence d'antioxydants, la réaction s'auto-entretient car les espèces produites peuvent à nouveau réagir entre elles.

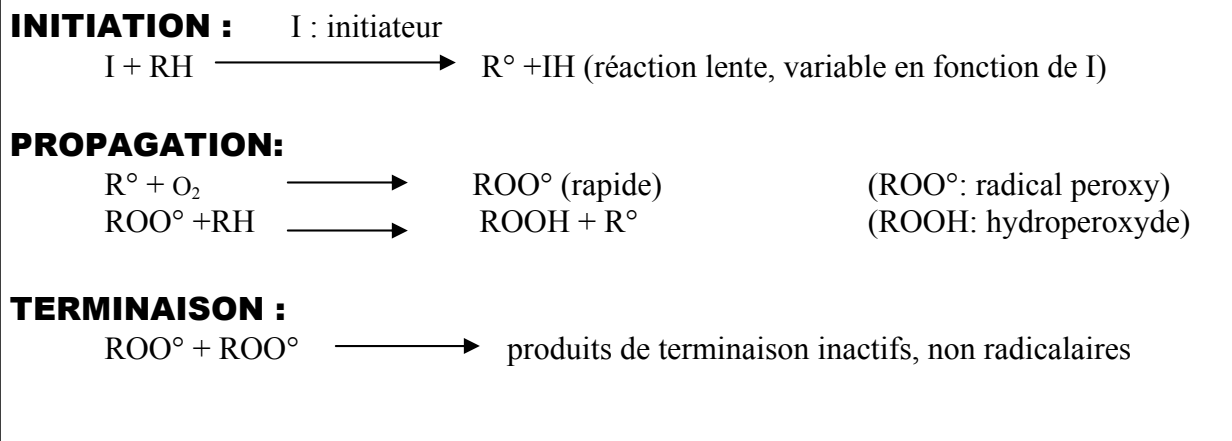


Figure 3. Mécanismes de la peroxydation lipidique

Cette réaction est à l'origine de la formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ceux-ci s'accumulant dans la membrane, entraînent la diminution de sa fluidité et de sa perméabilité. Sa fonction étant complètement perturbée, la membrane se désorganise. Si les dégâts sont trop importants, les peroxydes peuvent conduire à la mort de la cellule.

Les peroxydes lipidiques peuvent aussi réagir avec d'autres composés cellulaires et être à l'origine de molécules très toxiques. Par exemple, ils peuvent réagir avec l'ADN et être à l'origine de substances mutagènes.

1.4.2.4.

L'ADN

Les radicaux libres et en particulier OH° , peuvent s'attaquer à l'ADN. Ils réagissent avec les nucléotides. Ils peuvent mener, par exemple, à des modifications des bases azotées, à la fragmentation de l'ADN, à des ruptures de brins ou à des pontages entre des bases. Les conséquences de ces altérations peuvent être immédiates. La cellule, n'étant plus capable de fonctionner correctement, entre en apoptose. Cependant, ces conséquences peuvent aussi s'exprimer sur du plus long terme. Les modifications de l'expression du programme génétique de la cellule peuvent être à l'origine d'un cancer.

Les radicaux libres peuvent être à l'origine de multiples lésions cellulaires. C'est pourquoi, ils seraient impliqués dans le développement de maladies telles que le cancer, les maladies neuro-dégénératives et la pathogenèse des infections virales... Ils peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme. Ils peuvent léser des neurones et entraîner leur mort. L'accumulation avec l'âge des radicaux et donc des dégâts qu'il génèrent, seraient un des facteurs expliquant le vieillissement cellulaire.

Pourtant, à côté de ces effets néfastes, les radicaux libres sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Leur action est essentielle lors de la phagocytose. De plus, des travaux récents mettent en évidence leur rôle dans la communication cellulaire.

2. Les systèmes de défense et le stress oxydatif

2.1. Les systèmes antioxydants

Les antioxydants sont définis par **HALLIWELL (1999)** comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ils peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine.

2.1.1. Modes d'action des antioxydants

Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents (Tableau 2).

Tableau 2. Principaux modes d'action de quelques antioxydants

| | NATURE | MODE D'ACTION |
|---------------------------|-----------------------------|---|
| Défenses non enzymatiques | Vitamine E | |
| | Vitamine C | |
| | Bêta carotène | |
| | Bêta carotène | |
| | Bêta carotène | Fixation des métaux de transition |
| | Ubiquinone, acide urique... | |
| Défenses enzymatiques | Superoxyde dismutase | Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde |
| | Catalase | Métabolise H ₂ O ₂ |
| | Glutathion peroxydase | Action réductrice sur H ₂ O ₂ et les hydroperoxydes |

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- Système de défense primaire : ex : la catalase (CAT), le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- Système de défense secondaire : ex : les tocophérols. Ces molécules sont dites « chain-breaking ». Elles réagissent avec les ROO° et/ou les R°, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O₂⁻) à très réactives (OH°).

2.1.2. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Figure 4).

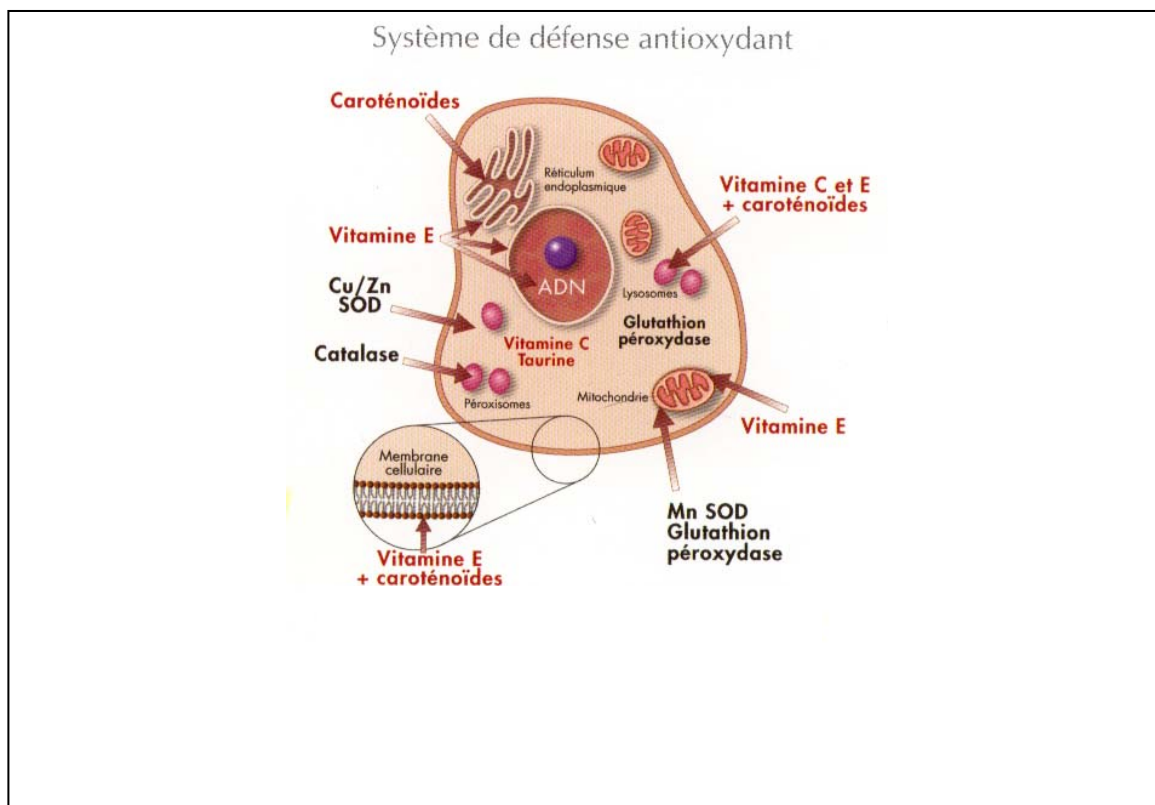


Figure 4. Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir) (d'après OPARA, 2002).

2.1.3. Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (Tableau 3) avec :

- les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
- les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

Tableau 3. Les deux types de protection antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.

| Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes | Systèmes antioxydants d'origine alimentaire |
|---|---|
| Superoxyde dismutase | Vitamine E |
| Glutathion peroxydase | Vitamine C |
| Catalase(s) | Taurine |
| Lipases, protéases, endonucléases (éliminent les molécules oxydées) | Caroténoïdes (lycopène, lutéine...) |
| Albumine, ferritine (complexent les ions divalents) | Polyphénols |
| | Minéraux et oligo-éléments |

2.2. Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux capacités antioxydantes de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture. Les défenses exogènes semblent les plus faciles à conforter puisqu'elles pourraient être renforcées par des apports de compléments alimentaires. Cela pourrait être très intéressant de les utiliser, par exemple, chez l'individu vieillissant. En effet, avec l'âge, les individus sont plus sensibles au stress oxydant. Leur capacité d'absorption intestinale de molécules antioxydantes d'origine alimentaire est moins efficaces. Les mécanismes de défenses endogènes de l'organisme s'essouffant avec l'âge, les espèces radicalaires se multiplient.

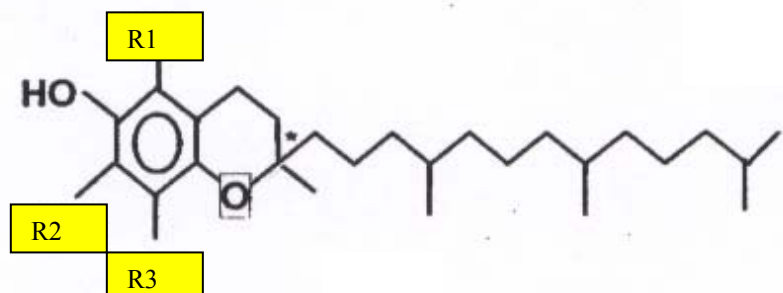
3. Les molécules utilisables en supplémentation

3.1. Vitamine E

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central), gamètes...

Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, α -, γ , δ -tocophérol, tocotriénols...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à 6 carbones substitué par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols).

α - tocophérol



| | R1 | R2 | R3 |
|----------------------|----|----|----|
| α -tocophérol | Me | Me | Me |
| β -tocophérol | Me | H | Me |
| γ -tocophérol | H | Me | Me |
| δ -tocophérol | H | H | Me |

Figure 5. Structure des composés à action vitaminique E.

Sa structure est à la base de son rôle dans l'organisme (Figure 5).

3.1.1. La vitamine E interrompt la phase de propagation de la réaction de peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique des phospholipides membranaires est un facteur de désorganisation et de dysfonctionnement cellulaire qui modifie la perméabilité et la fluidité de la membrane. Principal antioxydant liposoluble, la vitamine E a une action privilégiée pour limiter ce type de réactions (Figure 6). Elle intervient en interrompant la phase de propagation radicalaire des acides gras insaturés (AGI). Les tocophérols sont oxydés par RO^\bullet , ROO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ en quinones et semi-quinones.

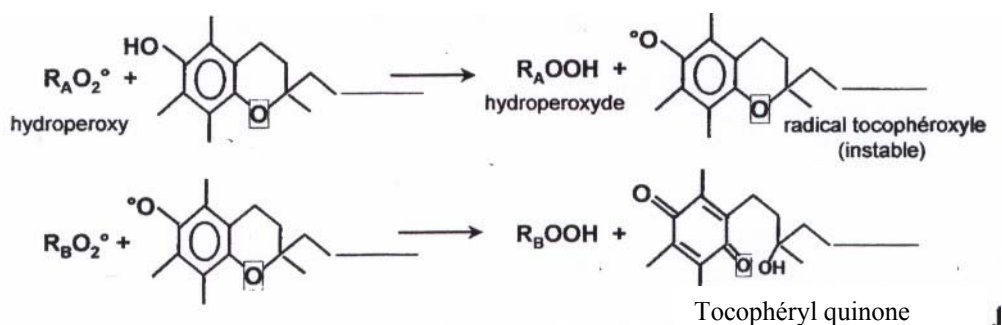


Figure 6. Action antioxydante de la vitamine E: interruption de la phase de propagation.

3.1.2. Les tocophérols piègent l'oxygène singulet

Les tocophérols inhibent les oxydations induites par l'oxygène singulet. L' α -tocophérol a une meilleure efficacité que le bêta et le delta. 40 à 120 molécules d'oxygène singulet peuvent être neutralisées, avant que ce tocophérol ne soit détruit. Cette activité est cependant 50 fois moindre que si elle était réalisée par les caroténoïdes.

3.1.3. Métabolisme de l'acide arachidonique

Le métabolisme de l'acide arachidonique ressemble à une peroxydation lipidique et enzymatique contrôlée. Les radicaux libres augmentent l'activité de la phospholipase A2 membranaire et la libération de l'acide carotène à partir des lipides membranaires. Celui-ci est à l'origine de la production de prostaglandines et de leucotriènes. Ces molécules interviennent ensuite dans les réactions inflammatoires, par exemple. En bloquant ce type de réaction, la vitamine E permettrait de limiter l'emballement de la réaction immunitaire et aurait des effets immunomodulateurs (Figure 7). Ce rôle sera plus détaillé dans la partie II.

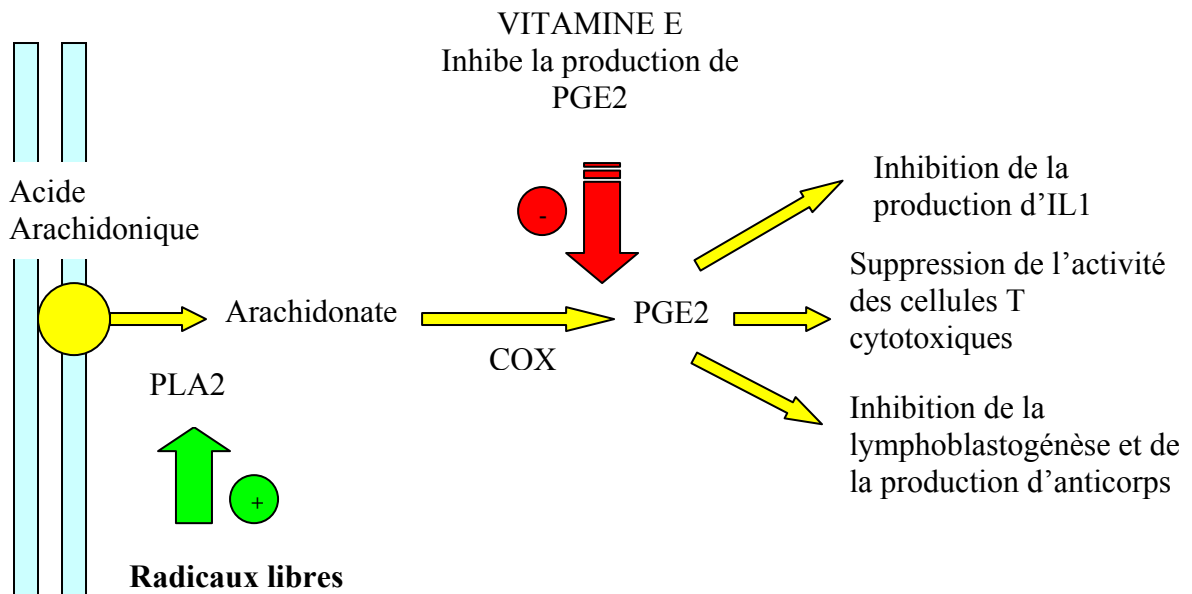


Figure 7. Effets des radicaux libres et de la vitamine E sur le métabolisme de l'acide carotène.

3.2. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est le plus important antioxydant hydrosoluble : son rôle est essentiel dans les compartiments intra- et extra-cellulaires. Son mécanisme d'action est mal connu. Il fait intervenir des réactions d'oxydoréduction entre la forme réduite de la vitamine C (l'acide ascorbique) et sa forme oxydée (dehydroascorbate) (Figure 8).

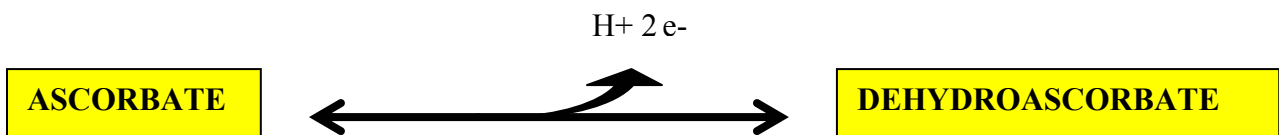


Figure 8. Réactions d'oxydoréduction faisant intervenir les différentes formes de la vitamine C.

L'ascorbate capte les anions superoxydes, hypochlorite, hydroxyl et l'oxygène singulet. Ses principaux rôles sont les suivants :

- *in vitro*, il inhibe la peroxydation lipidique avant la vitamine E.
- il protège les membranes vis à vis de l'attaque peroxydative, en piégeant efficacement les radicaux peroxydes ROO° dans la phase aqueuse, avant qu'ils puissent initialiser les peroxydations
- il participe à la régénération de la vitamine E
- il est capable de neutraliser l'oxygène singulet.

3.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une grande famille qui regroupe plus de 600 molécules (Tableau 4).

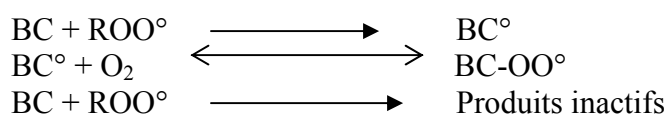
Tableau 4. Structure des principaux caroténoïdes (d'après LE MOEL, 1998)

| | |
|----------------|------------------|
| | |
| Polyène en C40 | |
| | |
| β-Carotène | β-Cryptoxanthine |
| | |
| α-Carotène | Zéaxanthine |
| | |
| Lycopène | Lutéine |

Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β-carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. Leur fonction dans l'organisme leur est propre et est indépendante de cette conversion.

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes:

- ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes :



BC : β-carotène

- ils empêchent l'initiation des réactions radicalaires en neutralisant l'oxygène singulet. Néanmoins, tous les caroténoïdes n'ont pas la même efficacité pour inactiver

l'oxygène singulet. Par ordre décroissant d'efficacité on classe : le lycopène puis le β -carotène et enfin la lutéine.

Comme la vitamine E, les caroténoïdes sont des molécules lipophiles. Ils sont localisés dans la membrane plasmique et participent donc à la protection et au maintien de l'intégrité cellulaire.

3.4. Polyphénols et flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes (thé, raisin, cacao, blé, orge, maïs, fruits et légumes...). Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes (Figure 10). En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices.

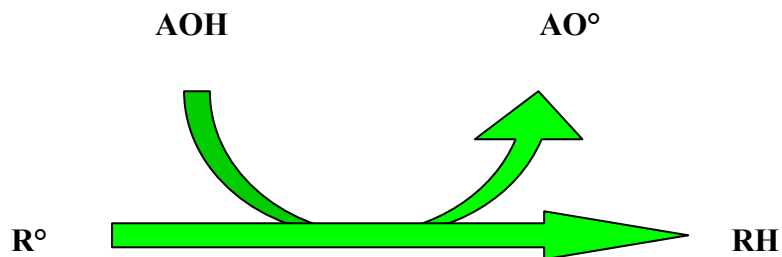


Figure 9. Activité principale des polyphénols : le piégeage de radicaux libres.

Le polyphénol (AOH) cède un atome H aux radicaux libres. Sa forme oxydée (AO°) est stabilisée ensuite par résonance ou dimérisation.

3.5. Taurine

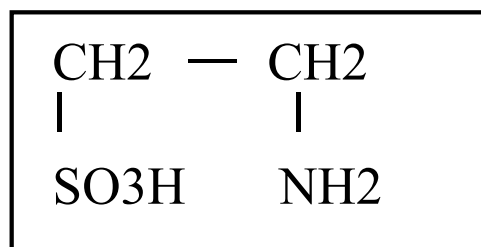


Figure 10. Structure de la taurine.

La taurine (acide 2-aminoethanesulfonique) est un acide aminé sulfoné (Figure 11). La majeure partie de cette molécule se trouve dissoute dans le cytosol soit liée aux membranes cellulaires. Son action dans l'organisme est mal connue. Elle serait capable d'inactiver des radicaux libres. A côté de son rôle dans les défenses antioxydantes, elle participerait aussi à la

régulation de la pression osmotique cellulaire en modifiant les concentrations intracellulaires de calcium.

La synthèse endogène de taurine est possible à partir de la cystéine et de la méthionine, chez le chien. Ce n'est donc pas un nutriment essentiel dans cette espèce. Chez le chat, par contre, l'activité de l'enzyme limitante de la réaction de synthèse de la taurine à partir de la cystéine et de la méthionine est plus faible que chez le chien. De plus, la taurine est aussi consommée pour conjuguer les acides biliaires. Cet équilibre précaire entre une synthèse endogène faible et une élimination biliaire explique que des besoins nutritionnels minimums aient été définis.

3.6. Oligo-éléments

Ces oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments, le zinc, le sélénium et le manganèse ont une action définie.

Les possibles actions antioxydantes du zinc sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5. Actions possibles du zinc comme antioxydant (d'après DI SILVESTRO, 2000).

| |
|---|
| Protection contre la diminution de concentration de la vitamine E |
| Stabilisation de la structure membranaire |
| Limitation de la production endogène de radicaux libres |
| Participation à la structure et à la fonction de l'enzyme extracellulaire à activité antioxydante : la superoxyde dismutase |
| Participation au maintien de la concentration tissulaire en métallothionine, molécule potentiellement capable de piéger les radicaux libres |

Le sélénium est connu pour ses propriétés antioxydantes. Il entre dans la constitution de la glutathion peroxydase (GPx). Cette enzyme sélénio-dépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique en catalysant la réduction des peroxydes dont le peroxyde d'hydrogène. D'autres rôles sont attribués à cette enzyme : elle interviendrait dans la transduction des signaux cellulaires, la régulation de l'expression de gènes (par son action au niveau des facteurs de transcription), l'induction de Bêta carotène et jouerait donc un rôle clé lors du cycle cellulaire.

Le manganèse appartient à la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale. Cette enzyme fait partie du système de défense antioxydant endogène de l'organisme. Elle permet la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

3.7. Minéraux

Nous citerons tout particulièrement, le magnésium. Il se trouve dans le chocolat, les produits céréaliers, les légumes et les fruits secs. Son déficit favorise la peroxydation lipidique.

Les vitamines E et C, les caroténoïdes, la taurine, certains minéraux et oligo-éléments ont tous des propriétés antioxydantes. Ces molécules peuvent potentiellement intervenir lorsqu'il existe un stress oxydatif. Le principe de leur emploi pour prévenir l'apparition et le développement de certaines maladies est donc justifié.

Nous avons mis en avant leurs propriétés anti-radicalaires, mais, il semble que ces molécules aient aussi d'autres propriétés mal connues que nous détaillerons ultérieurement au cas par cas. Ces dernières pourraient expliquer leur rôle dans la protection contre certaines maladies.

Cependant, les radicaux libres sont des molécules ambivalentes : malgré leurs effets délétères sur les systèmes biologiques, leurs interventions dans la communication cellulaire et dans la réaction immunitaire sont indispensables. Par conséquent, leur neutralisation à tout prix par l'utilisation massive d'antioxydants n'est peut-être pas indiquée dans tous les cas. Pour essayer d'apporter des éléments de réponse à ce problème, nous allons discuter de l'intérêt de la supplémentation à travers l'exemple de diverses maladies.

PARTIE II : ROLE DES ANTIOXYDANTS

Pour illustrer le rôle des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, nous allons détailler successivement plusieurs exemples. Ceux-ci ont été choisis car ils correspondent soit, à des situations où les animaux sont confrontés au stress oxydatif, soit, à des maladies où un stress oxydatif serait incriminé dans la pathogénie.

Il s'agit de :

- l'effort physique intense,
- la fonction immunitaire,
- le vieillissement,
- les maladies neurodégénératives : le syndrome de dysfonctionnement cognitif canin,
- les maladies oculaires : la cataracte et la dégénérescence maculaire,
- les maladies ostéo-articulaires : l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde,
- les maladies cardio-vasculaires : les cardiopathies induites expérimentalement ou non,
- le cancer,
- le diabète de type I et la formation de corps de Heinz chez le chat.

Nous nous plaçons dans le cadre d'une supplémentation apportée à un animal en bonne santé. Notre but est de savoir si l'enrichissement au quotidien de son alimentation permettrait de réduire l'occurrence des dommages oxydatifs et leur accumulation. Les antioxydants n'interviennent pas ici comme médicaments, mais comme moyen de prévenir l'apparition et le développement de lésions oxydatives pouvant déboucher ensuite sur des états pathologiques.

Dans chaque cas, nous insisterons sur l'implication du stress oxydatif dans l'apparition et l'entretien de ces phénomènes afin de justifier l'utilisation des antioxydants. Nous discuterons ensuite, de leur intérêt à partir des résultats des expériences de supplémentation réalisées. Finalement, nous tâcherons de mieux comprendre leurs mécanismes d'action afin de préciser leurs conditions d'utilisations.

1. Rôle des antioxydants chez l'animal sportif

1.1. Mécanismes de la production de ROS dans le muscle soumis à un effort

La production de radicaux libres à la suite d'une activité physique est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. Lors de la réalisation d'un effort, la consommation d'O₂ augmente proportionnellement à l'intensité de l'exercice. Trois à cinq pour cent de cet O₂ consommé est inévitablement réduit en ROS, donc la quantité de ROS produite est plus importante chez un animal sportif que chez un animal à l'entretien.

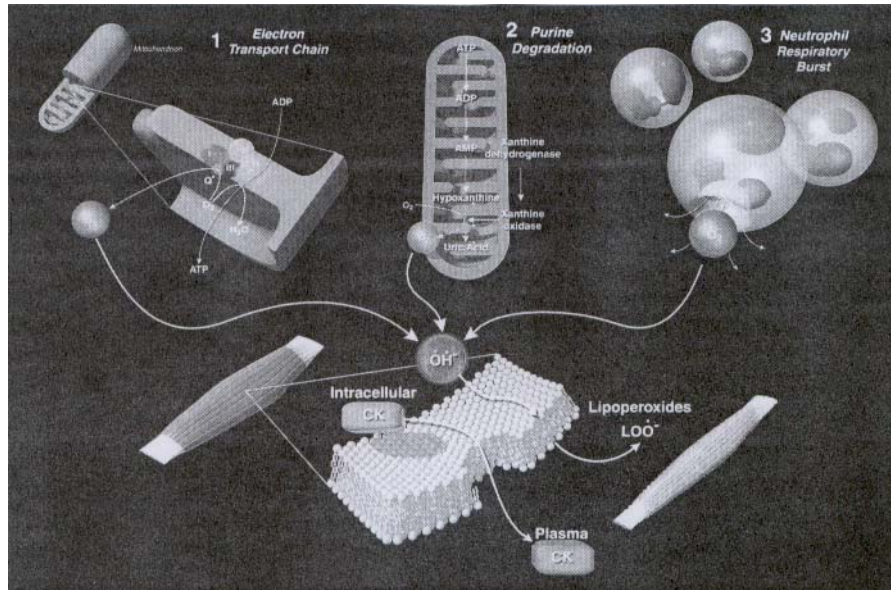


Figure 11. Mécanismes de production de radicaux libres pendant un exercice (d'après HINCHCLIFF, 2000).

1. métabolisme oxydatif, 2. Dégradation des purines, 3. Activité respiratoire oxydative dans les cellules phagocytaires.

Il existe trois mécanismes principaux de production des radicaux libres dans un muscle soumis à un effort physique (Figure 12) :

- la chaîne de respiration oxydative dans la mitochondrie
- les réactions catalysés par la xanthine oxydase
- les phénomènes oxydatifs dû à l'activité des cellules phagocytaires comme les macrophages et les neutrophiles.

Nous allons détailler chacun de ces mécanismes successivement.

Lors des réactions de phosphorylations oxydatives se déroulant dans la mitochondrie pour produire de l'ATP, des radicaux libres sont inévitablement produits. Les muscles soumis à un effort ayant particulièrement besoin d'énergie, sont des sites privilégiés de formation de ROS par ce mécanisme.

Les réactions catalysées par la xanthine oxydase lors des phénomènes d'ischémie-reperfusion sont à l'origine de la production de ROS. En effet, l'ischémie entraîne la dégradation de l'ATP en ADP et AMP qui, lors de la reperfusion, sont dégradés par la xanthine déshydrogénase en hypoxanthine puis par la xanthine oxydase en acide urique avec en présence d'oxygène production d'ions superoxyde. Il est tout à fait possible que de telles réactions se déroulent dans le muscle car c'est un tissu où les concentrations en xanthine, hypoxanthine et O_2 sont très fortes.

Enfin des signes d'inflammation sont mis en évidence dans le muscle soumis à un effort intense. Ils pourraient être la conséquence de la présence de neutrophiles et de macrophages activés, attirés dans les tissus en souffrance. Ces cellules peuvent être à l'origine de la production de ROS. L'existence d'un temps de latence entre l'arrivée et l'infiltration des neutrophiles dans le tissu musculaire et la mise en évidence des ROS expliquerait pourquoi ceux-ci seront mis en évidence lors de la phase de repos suivant un effort intense ou lors d'exercice de type endurance et non immédiatement après un effort violent de courte durée.

1.2. Conséquences de la présence des radicaux libres oxygénés dans le muscle

Les ROS sont à l'origine de différentes réactions comme la peroxydation des lipides et peuvent également créer des lésions sur l'ADN.

1.2.1. Action sur les lipides

Les ROS attaquent les lipides membranaires, ce qui conduit à la rupture des membranes cellulaires et à la libération du contenu intracellulaire. Une enzyme, la créatine kinase (CK), est un marqueur des dommages musculaires. Sa concentration augmente à la suite d'une rupture de la membrane des myocytes. De haute spécificité mais de faible sensibilité, la CK est souvent utilisée pour diagnostiquer une souffrance musculaire

Une étude a été menée par **HINCHCLIFF *et al.* (2000)** pour mesurer les effets d'une activité physique (course d'endurance de 58 km par jour sur trois jours consécutifs) sur l'**activité de la créatine kinase dans le sérum** de 24 chiens de traîneaux (Figure 13).

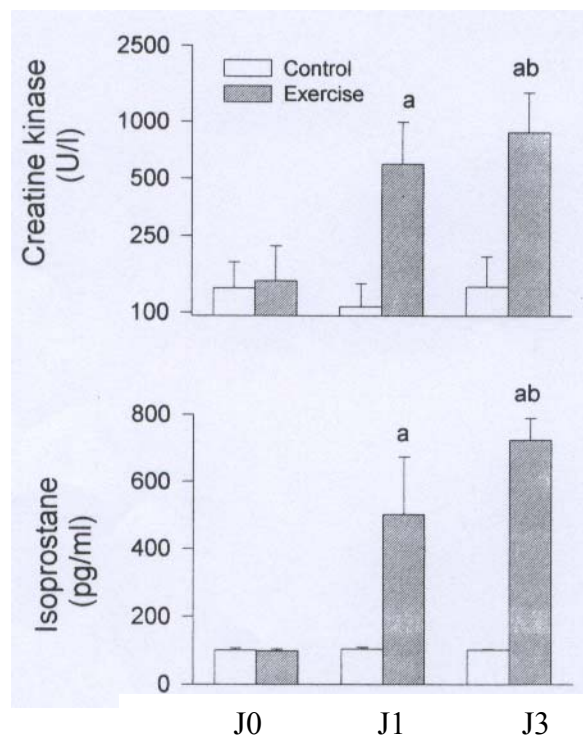


Figure 12. *Activité moyenne de la créatine kinase sérique (graphique du haut) et de la concentration plasmatique en isoprostanes (graphique du bas) de deux groupes de chiens de traîneaux (d'après HINCHCLIFF, 2000).*

Le groupe « control » est au repos. Le groupe « exercise » est soumis à une course intense de trois jours consécutifs. Les mesures sont effectuées avant, après le premier et après le troisième jour de course.

Cette étude montre que l'activité de la CK dans le sérum des chiens du groupe témoin reste à peu près constante, mais augmente significativement dès le premier jour dans le sérum du groupe des chiens soumis à l'activité physique. Les **isoprostanes plasmatiques** ont aussi été dosées. Ces molécules sont des marqueurs spécifiques de la peroxydation des lipides. Leur concentration augmente significativement dès le premier jour de course. Ces résultats ont été confirmés par **BIOURGE *et al.* (1999)**. Après 10 jours consécutifs de course, la concentration en **isoprostanes urinaires** de 8 chiens Huskies a aussi augmenté.

Une corrélation positive entre la concentration plasmatique en isoprostanes et le logarithme de l'activité de la CK dans le sérum a été mise en évidence. La concentration plasmatique de ces deux marqueurs de l'existence de réactions d'oxydation augmente suite à un exercice physique intense. Cela semble montrer l'action délétère des ROS produits au cours d'un effort, au niveau musculaire.

Pourtant, si un autre marqueur de l'action des ROS sur les lipides est dosé, comme la concentration plasmatique en hydroperoxydes dans l'étude de **BASKIN *et al.* (2000)**, aucun effet de l'exercice n'a été mis en évidence. Une explication fournie est que l'intensité de l'exercice auquel étaient soumis les chiens n'a pas suffi à déclencher la formation d'hydroperoxydes.

1.2.2. Modifications sur l'ADN

Le **7,8 dihydro-8-oxo-2' deoxyguanosine (8-oxodG)** est utilisé comme marqueur des lésions sur l'ADN induites par les ROS. L'étude de **BASKIN *et al.* (2000)** a montré que sa concentration plasmatique augmentait significativement pendant et après un exercice d'endurance (course sur trois jours consécutifs) (Figure 14). Ce qui met en évidence un effet délétère des ROS sur l'ADN.

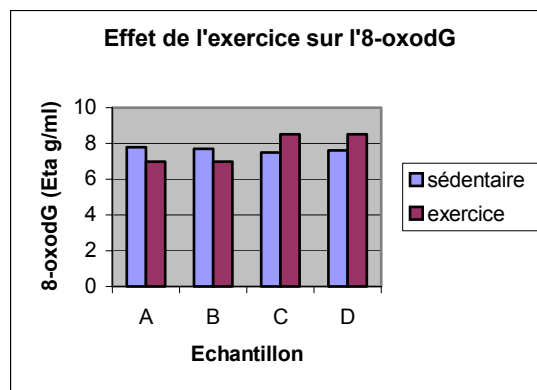


Figure 13. Concentrations plasmatiques moyennes en 7,8 dihydro-8-2' deoxyguanosine (8-oxodG) dans un groupe de chiens sédentaires et un groupe de chiens pratiquant un effort physique (d'après BASKIN, 2000).

Les chiens n'ont reçu aucun supplément alimentaire contenant des antioxydants. Les échantillons sanguins sont recueillis avant l'exercice (A), après 1 et 3 jours de course (B et C respectivement) et après 3 jours de repos (D).

L'augmentation de l'activité de la CK, de la concentration en isoprostanes et du 8-oxodG à la suite d'un effort musculaire confirme l'hypothèse selon laquelle, consécutivement

à une activité physique intense, des RL sont produits et génèrent des lésions au sein du muscle.

Pour mettre en évidence l'existence d'un stress oxydatif dans le muscle, il est intéressant d'évaluer le statut des molécules capables de le défendre contre les RL. Théoriquement, elles sont consommées pour faire face à ce stress. Les chercheurs s'attendent donc à voir leurs concentrations plasmatiques chuter.

1.3. Evolution du statut antioxydant du muscle après un effort

1.3.1. Molécules à activité antioxydantes enzymatiques

Après une course d'endurance sur 3 jours, HINCHCLIFF *et al.* (2000) ont montré que les concentrations plasmatiques en SOD et GPx n'étaient pas significativement modifiées, contrairement à celle de l'acide urique. Cela illustre le pouvoir anti-radicaux libres de cet acide. Par contre, l'absence de diminution des concentrations des enzymes est inattendue et inexpliquée.

1.3.2. Molécules à activité antioxydantes non enzymatiques

Les études de HINCHCLIFF *et al.* (2000), SCOTT *et al.* (2001) et de PIERCY *et al.* (2000) se sont intéressées aux variations de la concentration plasmatiques en vitamine E à la suite d'une activité physique. Elles ont mis en évidence une diminution de la concentration de cet antioxydant au cours de la réalisation d'un effort (Figure 15).

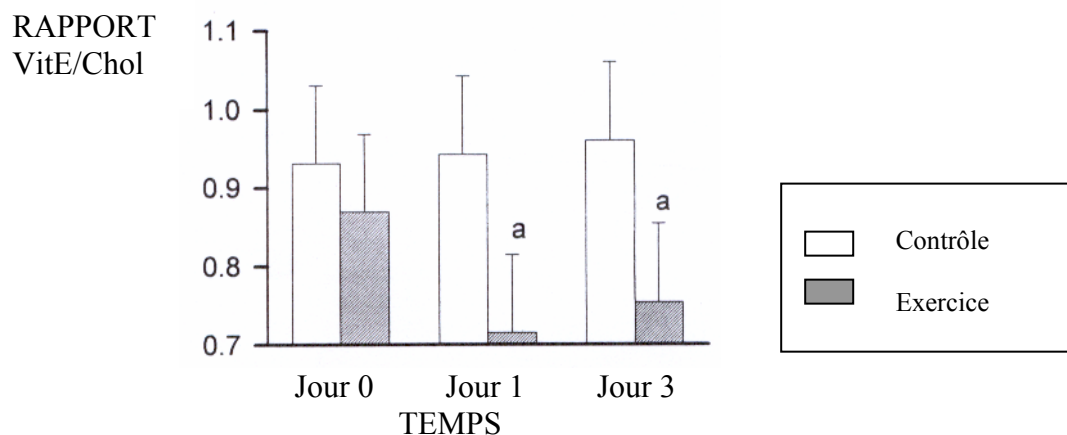


Figure 14. Concentration plasmatique moyenne de vitamine E rapporté à la concentration sérique de cholestérol de deux groupes de chiens de traîneaux (d'après HINCCLIFF, 2000).

Le groupe « contrôle » est au repos. Le groupe « exercice » est soumis à une course se déroulant sur 3 jours consécutifs. Les prélèvements ont eu lieu 1 à 3 heures après la fin de la course. La concentration plasmatique de vitamine E est rapportée à la concentration sérique de cholestérol afin de tenir compte de l'hémoconcentration consécutive à l'effort.

D'après PIERCY *et al.* (2000) et BASKIN *et al.* (2000), les concentrations plasmatiques en vitamine C et en rétinol ont été diminuées aussi après un exercice.

Par contre, aucune diminution de la concentration en lutéine n'a été mise en évidence par **BASKIN *et al.* (2000)**. Ceci pourrait être expliqué par le fait que cet antioxydant ne serait pas utilisé en priorité par rapport aux autres, pour faire face à la production de radicaux libres (RL).

1.3.3. Molécules qui piègent les ions

D'après **HINCHCLIFF *et al.* (2000)**, l'activité plasmatique de la céruloplasmine, protéine de transport liant la forme réactive oxydante du cuivre, est significativement diminuée après trois jours de courses comparée à celle d'un groupe de chiens témoins sédentaires.

1.3.4. Mesure du statut antioxydant total du plasma

PIERCY *et al.* (2000) ont mis en évidence une diminution du statut antioxydant total (TAS) de 20 chiens soumis à trois jours de course d'endurance.

Par contre, un résultat différent a été obtenu dans l'étude de **HINCHCLIFF *et al.* (2000)**. Le TAS mesuré sur 8 chiens soumis à 3 jours de course n'a pas été significativement différent de celui mesuré sur 8 autres chiens au repos. Ce résultat est surprenant car cette dernière étude a mis en évidence la diminution de concentration en vitamine E à la suite de l'exercice. La valeur du statut antioxydant plasmatique total est une mesure globale prenant en compte de nombreux facteurs. Une explication possible serait que la diminution de la concentration en vitamine E (mesure pris en compte dans le calcul du TAS) serait compensée par l'augmentation d'un autre facteur comme par exemple, dans notre cas, l'acide urique.

Finalement, ces différentes études confirment l'existence d'un stress oxydatif consécutif à un effort physique intense. Les molécules à activité antioxydante (vitamine E, C, rétinol, céruloplasmine et acide urique) sont recrutées pour faire face à la production de ROS et sont peu à peu consommées. Leur concentration cellulaire va donc diminuer, puis l'organisme ne pourra plus s'opposer à la production d'espèces oxydantes. Les dégâts sur les lipides membranaires (ici traduit par l'augmentation des CK et des isoprostanes) et sur l'ADN vont alors apparaître. Cela a conduit de nombreux auteurs à formuler l'hypothèse selon laquelle supplémenter en antioxydants les animaux soumis à un exercice physique intense permettrait de réduire le stress oxydatif et d'éviter les dommages causés par les ROS en renforçant les défenses de l'organisme. Pourtant les mécanismes déterminant le statut antioxydant d'un animal et la pathogénie des dommages créés par le stress oxydatif sont encore mal compris et restent à étudier. Quelques études expérimentales sur les effets de la supplémentation en antioxydants du chien soumis à un stress d'effort existent, même si elles sont beaucoup moins nombreuses que chez l'homme ou les rongeurs.

1.4. Une supplémentation en antioxydant serait-elle utile et bénéfique ?

1.4.1. Un modèle d'étude : le chien sportif

Les expériences de supplémentation ont surtout été menées sur les chiens de traîneaux (Alaskan Husky) et les chiens de courses (Greyhounds). Les chiens de traîneaux sont un modèle d'étude particulièrement intéressant pour évaluer le stress oxydatif induit par l'effort. Ils ont un volume d' O₂ max. plus élevé que les autres chiens, c'est à dire que la quantité d'O₂ apportée aux cellules est plus importante et donc, que la production de ROS le serait aussi. Leur ration alimentaire contient beaucoup de graisses pour faire face à leurs fortes dépenses énergétiques. Il faut en tenir compte pour calculer la quantité d'antioxydants utile en supplémentation car ceux-ci peuvent déjà être consommés rien que pour neutraliser les réactions de peroxydations des lipides dans l'aliment. De plus, ces chiens sont soumis à un effort physique intense dans des conditions extrêmes : ils parcourent des distances de 60 km par jour, lors des grandes compétitions en Alaska. Enfin, les entraîneurs de ces chiens de traîneaux donnent communément, mais de façon tout à fait empirique, de grandes doses d'antioxydants comme des vitamines E et C, croyant ainsi augmenter les performances de leurs chiens et diminuer le risque de blessures. Il est donc intéressant de formaliser cela.

1.4.2. Les données des expériences de supplémentation

1.4.2.1. Aptitude de la supplémentation à prévenir les dommages causés par les radicaux libres

Différents travaux ont été menés pour étudier les effets de la supplémentation.

PIERCY *et al.* (2000) ont supplémenté 21 chiens de traîneaux avec 457U d'acétate d' α -tocophérol, 706 mg d'acide ascorbique et 5.1 mg de β -carotène. Les résultats sont surprenants. La valeur de la CK est restée élevée après l'effort. La supplémentation n'a donc pas réussi à atténuer l'augmentation de la CK induite par l'exercice.

L'étude de **MARSHALL *et al.* (2002)** n'a pas mis non plus en évidence un effet probant de la supplémentation en vitamine C. Le TBARS (Thiobarbituric Acid-Reducing Substances, marqueur de l'oxydation) et le TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity, marqueur de la capacité antioxydante totale) n'ont pas été affectés par l'administration de 1g d'acide ascorbique.

Ces deux expériences ne sont pas parvenues à montrer leur utilité.

Inversement, d'autres expériences ont démontré les effets positifs de la supplémentation. Selon **MOQUET (2000)**, l'ajout de 250-300 mg de vitamine E par kilo de nourriture a eu comme effet chez des chiens de traîneaux soumis à des exercices d'intensité variable :

- de réduire la valeur des isoprostanes urinaires,
- d'augmenter le rapport de la concentration globulaire en AGPI sur celle en acides gras saturé (AGPI/AGS) chez les chiens ayant effectué un exercice modéré ou intense,
- de diminuer de manière importante les concentrations des acides gras poly-insaturés globulaires et plasmatiques dans les groupes non supplémentés par rapport aux groupes supplémentés.

Dans l'étude de **BASKIN et al. (2000)**, la supplémentation avec 20 mg de lutéine, 3 mg de β -carotène et 400 UI d'acétate d' α -tocophérol est associée à la diminution des dommages oxydatifs sur l'ADN et à une augmentation de la résistance des lipoprotéines de faible densité (LDL) et de très faible densité (VLDL) à l'oxydation, même si aucun effet de la supplémentation n'a été mis en évidence sur la vitesse maximale de l'oxydation des LDL et VLDL.

Enfin, **BIOURGE et al. (1999)** ont mis en évidence un effet bénéfique de l'administration de vitamine E. Le statut antioxydant plasmatique des chiens supplémentés avec 1000 UI d' α -tocophérol/d (forme dextrogyre), pendant un mois, a été significativement réduit après un effort.

Les résultats divergent donc quant aux effets de la supplémentation. Des résultats variables ont été obtenus selon les antioxydants utilisés (Vitamines E, C, lutéine, β -carotène, gluconate de zinc), leurs différentes combinaisons et les doses administrées. Les marqueurs utilisés pour évaluer la résistance d'un organisme aux dommages causés par la présence de ROS, ont été multiples : CK, 8 oxodG, LDL-VLVL, PAS, AGPI/AGS, isoprostanes urinaires, TEAC et TBARS. Ceci explique, peut-être, la difficulté qu'ont eu les chercheurs à accorder leurs conclusions.

1.4.2.2. *Aptitude de la supplémentation à renforcer les défenses antioxydantes de l'organisme*

Huit greyhounds ont été supplémentés dans l'expérience de **HINCHCLIFF et al. (2000)**, avec 0.25 g d'acétate d' α -tocophéryl (680 UI). La diminution de la concentration en α -tocophérol existant chez les chiens non supplémentés après une course, a été évitée. Sa concentration est passée de 26.6 +/- 5.2 mg/l à 29.8 +/- 3.6 mg/l après l'effort, chez les greyhounds supplémentés (cette différence n'est pas statistiquement significative).

De la même façon, huit Alaskan Huskies ont été supplémentés avec 1000 IU d' α -tocophérol/d par **BIOURGE et al. (1999)**. Leur concentration plasmatique en vitamine E a été diminuée après une course de dix jours, mais moins que celle des chiens non supplémentés.

Enfin l'étude de **BASKIN et al. (2000)** a confirmé ces résultats et a montré, sur un groupe de vingt-deux chiens de traîneaux supplémentés avec un cocktail vitaminique comprenant 400 UI d'acétate d' α -tocophérol, une moindre diminution de la concentration en α -tocophérol induite par l'exercice, comparé à un groupe de chiens non supplémentés. La supplémentation en vitamine E permettrait donc bien d'éviter la diminution de sa concentration plasmatique après un exercice et donc de renforcer les défenses de l'organisme. Selon le même principe, **MARSHALL et al. (2002)** ont supplémenté des greyhounds avec 1g d'acide ascorbique, deux fois par semaine pendant quatre semaines par. Après une course, la concentration plasmatique en acide ascorbique a été plus élevée comparativement aux chiens non supplémentés.

L'étude de **DONOGHUE et al. (1993)** a mis aussi en évidence une concentration en ascorbate de 29-50-46 % (prise de sang au mois de décembre-mars-avril respectivement sur une saison de course) plus élevée chez les chiens de traîneaux supplémentés avec de l'acide ascorbique par rapport aux non supplémentés. Cette augmentation est encore de 19-39-42 % plus élevée chez les chiens de traîneaux supplémentés avec de l'acide ascorbique et du gluconate de zinc par rapport aux chiens supplémentés seulement avec du gluconate de zinc.

Après une supplémentation dans l'aliment, les vitamines voient leurs concentrations plasmatiques augmenter. Cela signifie-t-il que l'organisme est plus apte à réagir à un stress ? Le bénéfice en molécules antioxydantes acquis par la supplémentation est-il directement utilisable et fonctionnellement efficace pour lutter contre les ROS ? La meilleure capacité des chiens supplémentés à lutter contre le stress oxydatif devrait se traduire par une moindre diminution de la concentration des molécules à activité antioxydantes après un exercice puisqu'elles sont en excès par rapport aux ROS (*cf. supra*).

1.4.2.3. *Effet de la supplémentation sur les performances*

Les effets de la supplémentation en antioxydants sur les performances sont évidemment espérés, mais les résultats sont contradictoires.

Dans l'étude de **PIERCY *et al.* (2000)**, les entraîneurs qui ne savaient pas quels suppléments ont reçu leurs chiens, ont semblé trouver subjectivement que les chiens supplémentés ont eu de meilleures performances que les non supplémentés. De plus, 8/20 chiens non supplémentés, contre 4/21 supplémentés seulement ont exprimé de la douleur et une fatigue musculaire généralisée, après un exercice intense.

Les résultats de l'étude de **DONOGHUE *et al.* (1993)** semblent confirmer cette simple constatation. Les performances ont été évaluées selon une grille et notées par un indice. Si les notes n'ont pas été différentes entre les régimes durant l'entraînement, elles ont été 33 % plus élevées dans le groupe des chiens de traîneaux supplémentés avec 500-1000 mg vitamine C, par rapport au groupe témoin, lors de la dernière course. Une corrélation statistiquement positive a été démontrée entre l'indice de performance et la concentration plasmatique en ascorbate.

Par contre, **MARSHALL *et al.* (2002)** ont montré un effet tout à fait contraire de la supplémentation en vitamine C. Les chiens supplémentés avec 1 g. d'acide ascorbique ont couru 0.2 seconde moins vite que les non supplémentés, sur une course de 500m. A de très fortes doses de vitamines C, des effets délétères de la supplémentation apparaîtraient-ils ?

HILL *et al.* (2001) se sont intéressés à la supplémentation avec de la vitamine E. La durée de la course de huit greyhounds supplémentés avec 100 UI d'acétate d' α -tocophérol pendant 8 semaines a été de 32.54 +/- 0.28 s contre 32.18 +/- 0.35 pour les non supplémentés ($p > 0.05$). Malgré tout, si la supplémentation est de 1000 UI, les chiens non supplémentés ont couru plus vite que les supplémentés. Les durées de course ont été respectivement de 32.85 +/- 0.34 s contre 33.35 +/- 0.35 s. De très fortes doses en antioxydants auraient-elles des effets opposés à ceux attendus ?

Jusqu'à présent, nous avons mis en parallèle les avantages et les inconvénients de la supplémentation en antioxydant. Ces résultats sont tous récapitulés aux tableaux 6 et 7. Des effets positifs existent certes, mais parfois aucune conséquence n'a suivi l'administration d'antioxydants, voire il a été observé une influence négative. Quelques aspects particuliers à l'étude de l'intérêt des antioxydants en supplémentation chez l'animal sportif méritent, néanmoins, d'être soulignés.

1.5. Quelques points méritent réflexion

1.5.1. Correction des concentrations plasmatiques en antioxydants

Lors d'un effort physique, il y a une hémococoncentration et une diminution du volume plasmatique qui doit être prise en compte dans le calcul de la concentration, par exemple, en vitamine E. C'est pour cela que la concentration mesurée doit être corrigée en tenant compte de ce phénomène, avant de pouvoir interpréter les résultats expérimentaux. Rappporter la concentration de vitamine E au cholestérol plasmatique par exemple, comme dans le travail de **HINCHCLIFF *et al.* (2000)**, permet de prendre en compte cette modification.

1.5.2. Nature de l'exercice auquel sont soumis les chiens

La nature de l'exercice est aussi un facteur de variation. L'intensité de l'effort, en particulier, est un facteur de variation de la production des ROS. Ceux-ci sont produits lors d'un exercice long avec épuisement, de type course d'endurance et peu lors d'effort de type sprint.

Par exemple, la thèse de **MOQUET (2000)** s'est intéressée aux variations des concentrations de deux marqueurs de stress oxydatif, en fonction de l'intensité de l'effort auquel ont été soumis des chiens de traîneaux (effort faible, modéré, intense). Ainsi, le taux d'isoprostanes urinaires a augmenté avec l'intensité de l'exercice physique. Le rapport AGPI/AGS n'a pas varié pas pour des efforts faibles à modérés, mais a été modifié pour un effort intense. Les effets de la supplémentation en vitamine E ont été variables selon l'intensité de l'exercice. Ainsi, le rapport AGPI/AGS (acides gras érythrocytaires) a été augmenté après un effort modéré ou intense, à l'inverse de ce qui a été observé après un exercice faible.

L'entraînement semble aussi avoir une valeur protectrice contre le stress oxydatif. Les défenses antioxydantes de l'organisme sont accrues, probablement, après une exposition chronique et intermittente des tissus aux ROS. Les Greyhounds et les Alaskan Huskies utilisés dans les expériences auxquelles nous nous sommes intéressés étaient des sportifs de haut niveau qui s'entraînaient régulièrement. La supplémentation aurait-elle les mêmes effets sur des chiens non entraînés ?

Tableau 6. Comparaison de huit protocoles expérimentaux étudiant les effets de la supplémentation en antioxydants sur des chiens soumis à un effort physique, classé selon la nature et la dose d'antioxydants administrés (vitamine C, E, β -carotène, lutéine et zinc), la durée de la période de supplémentation et le type d'exercice.

| N° | α -tocophérol acétate | vitamine C | β -carotène | Lutéine | Gluconate de zinc | Durée de la supplémentation | Type d'exercice |
|----|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| 1 | 680 U/j | | | | | 1 sem | sprint |
| 2 | 457 U/j | 706 mg/j | 5,1 mg/j | | | 3 sem | endurance |
| 3 | 400 U par jour | | 3 mg par jour | 20 mg par jour | | 1 mois | endurance |
| 4 | | 1g/j | | | | 4 sem | sprint |
| 5 | 1000 U/j | | | | | 8 sem | sprint |
| 6 | 250-300 mg/kg de nourriture/j | | | | | | |
| 7 | | 500mg/j pendant 3 mois puis 1000 mg/j | | | 30mg/j pendant 3 mois puis 60 mg/j | saison de course | saison de course |
| 8 | 1000 U par jour | | | | | 1 mois | endurance |

Le protocole expérimental n°1 est issu de **SCOTT et al. (2001)**. Le protocole expérimental n°2 est issu de **PIERCY et al. (2000)**. Le protocole expérimental n°3 est issu de **BASKIN et al (2000)**. Le protocole expérimental n°4 est issu de **MARSHALL et al. (2002)**. Le protocole expérimental n°5 est issu de **HILL et al. (2001)**. Le protocole expérimental n°6 est issu de **MOQUET (2000)**. Le protocole expérimental n°7 est issu de **DONOGHUE et al. (1993)**. Le protocole expérimental n°8 est issu de **BIOURGE et al. (1999)**.

Tableau 7. Influence de la supplémentation alimentaire en antioxydants selon huit protocoles d'enrichissement définis au tableau 6 sur différents marqueurs du stress oxydatif.

| N°. | Concentration en vitamine C | Concentration en vitamine E | Performance | CK | 8 oxodG | LDL-VLDL | PAS | P/S | Isoprostane urinaire | AGPI/AGS | TEAC | TBARS |
|-----|--|---|-------------------------|------------------------------------|------------|---|--------|---------------|----------------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | | mitige la diminution de AT après l'exercice | | | | | | | | | | |
| 2 | | | augmentation subjective | pas de diminution après l'exercice | | | | | | | | |
| 3 | | | | | Diminution | Augmentation de la résistance à l'oxydation | | | | | | |
| 4 | plus élevée après la course | idem | diminution | | | | | | | | pas d'effet | pas d'effet |
| 5 | | | diminution | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | réduction | augmentation | | |
| 7 | enraye la diminution de la teneur plasmatique en acide ascorbique durant la saison de course | | augmentation | | | | | | | | | |
| 8 | | idem | | | | | réduit | réduction NSS | NSS | | | |

Résultats en faveur

Résultats mitigé

Résultats en défaveur

NSS : non statistiquement significatif

Selon les marqueurs (indice de performance, CK, 8-oxodG...) utilisés pour évaluer les effets de la supplémentation, les résultats sont différents. Selon la nature des antioxydants utilisés, seuls ou en combinaison, la période d'administration et surtout la dose administrée, les effets sur les animaux ont été plus ou moins bénéfiques, voire délétères. De nouvelles études doivent encore être menées pour définir les mécanismes impliqués lors d'un effort musculaire, pour définir les bases d'une utilisation rationnelle des antioxydants. Il semble, en effet, que leur utilisation raisonnée à des doses peu élevées sont bénéfiques même si les effets sont finalement discrets.

2. Rôle des antioxydants dans le système immunitaire

Les effets de la supplémentation en antioxydants sur le système immunitaire sont étudiés chez l'homme et les animaux de laboratoire, moins chez le chien et le chat. Nous allons présenter les données expérimentales disponibles et apprécier les bénéfices que l'on peut retirer de l'utilisation de certaines molécules, en particulier de la lutéine et du β -carotène. Pour mesurer les effets de la supplémentation alimentaire sur le système immunitaire, plusieurs indices ont été évalués, comme :

- *le phénomène d'hypersensibilité retardé (HSR)* : à la suite de l'injection intradermique d'un antigène, l'épaisseur de la peau au site d'injection est mesurée. Cette réponse cutanée permet d'évaluer *in vivo* la réponse médiée par les lymphocytes T. Ce type de test reflète donc la réaction immunitaire à médiation cellulaire (RIMC). L'immunité non spécifique peut être stimulée avec les antigènes suivants : la concanavalin A (Con A) et la phytohémagglutinine (PHA). L'immunité spécifique peut être stimulée à l'aide d'un vaccin polyvalent atténué.

- *la multiplication des cellules mononuclées sanguines à la suite d'une stimulation antigénique* : avec la PHA ou la Con A, la réponse cellulaire est stimulée, à l'inverse, avec le « pokeweed mitogen » (PWM) la réponse humorale est stimulée.

- *les proportions des différents acteurs cellulaires de la réponse immunitaire* : savoir quelle population cellulaire T ou B est modifiée par la stimulation antigénique permet d'étudier le type de réaction immunitaire mis en jeu. Il s'agit soit de la réaction cellulaire soit de la réaction humorale.

- *la production d'interleukines (IL2)*

- *la concentration plasmatique en immunoglobulines (Ig G et Ig M).*

2.1. Effet de la supplémentation en antioxydants sur le système immunitaire

2.1.1. Le cas du chien

2.1.1.1. *Influence de la supplémentation sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire*

2.1.1.1.1. *Hyper Sensibilité Retarde*

Une expérience a été menée par **KIM *et al.* (2000, a)** sur 56 beagles femelles supplémentées avec 0, 5, 10 ou 20 mg de lutéine. Elle a permis d'étudier le délai d'apparition et l'intensité du phénomène d'HSR à la suite de l'injection intradermique de PHA et/ou d'un vaccin atténué 0, 6 et 12 semaines (S) après le début de la période d'étude. Alors qu'il n'y a aucun effet de la supplémentation sur l'épaisseur de la peau à S0, dès S6, les animaux supplémentés réagissent plus fortement à l'injection du vaccin et de PHA (la réponse à la PHA est deux fois plus forte que celle induite par le vaccin). La réaction est d'autant plus importante que la dose de lutéine utilisée est élevée. A S12, le même type de résultat est obtenu avec la PHA et le vaccin, même si la réponse à l'injection du vaccin n'est plus à cette

date significativement influencée par la dose de lutéine. Au vu de ces résultats expérimentaux, la lutéine semble influencer positivement la RIMC spécifique et non spécifique.

Selon le même principe, **KEARNS *et al.* (2000)** ont supplémenté des beagles femelles avec des doses de 0, 2, 20 ou 50 mg de β -carotène. L'étude de l'HSR après injection de PHA et d'un vaccin, a aussi montré que les chiennes supplémentées répondent plus fortement.

2.1.1.1.2. Population de cellules mononuclées sanguines périphériques

Un autre argument en faveur de la supplémentation alimentaire sur la RIMC est son influence favorable sur la population de cellules mononuclées sanguines périphériques, après stimulation par la PHA et la Con A.

Dans l'étude de **KIM *et al.* (2000, a)**, la population cellulaire est augmentée de façon plus forte chez les chiennes supplémentées en lutéine à S4 et S12. Par contre, le β -carotène n'a pas d'influence sur la prolifération de ces cellules après la stimulation antigénique.

Le pourcentage de cellules CMH II jouant le rôle de molécules présentatrices d'antigènes, est influencé positivement par la supplémentation avec la lutéine mais pas par celle en β -carotène. D'une meilleure présentation d'antigène aux différentes cellules effectrices de la réponse immunitaire, découle une meilleure communication intercellulaire et, ainsi, une plus forte production d'anticorps, par exemple. Donc, plus ces cellules du CMH II sont nombreuses, plus la réaction immunitaire est efficace.

2.1.1.1.3. Population des lymphocytes T

Un autre marqueur de la RIMC est la population cellulaire T.

KIM *et al.* (2000, a) ont mis en évidence une augmentation du pourcentage de cellules T à S8-S12 chez les animaux supplémentés.

D'après **CHEW *et al.* (2000, c)**, le pourcentage de lymphocytes T helper CD4+ et de T cytotoxiques a été plus élevé chez les chiennes supplémentées que chez celles nourries avec un régime de base. Par contre, le pourcentage de CD 8+ n'a pas été influencé par la supplémentation. Une remarque intéressante est le fait qu'aucun effet de la supplémentation en lutéine n'a pas été significatif avant S4 : cela suggère qu'il existe un temps de latence avant que les effets de la supplémentation soient efficaces.

Le fait que la réponse cutanée et les proportions de cellules T soient modifiées par une supplémentation alimentaire est intéressant, car il confirmerait que l'intensité de la RIMC à la suite d'une stimulation antigénique pourrait être influencée favorablement par l'utilisation d'antioxydants.

2.1.1.2. *Influence de la supplémentation sur la réponse immunitaire à médiation humorale*

Une façon d'apprécier la réaction immunitaire à médiation humorale (RIMH) est de mesurer des concentrations plasmatiques en immunoglobulines. Les travaux de **KIM *et al.* (2000, a)** sur l'influence de la supplémentation en lutéine sur les concentrations plasmatiques en Ig G sont présentés sur la figure 16.

La concentration en Ig G a été significativement plus élevée chez les chiens supplémentés à 5 mg de lutéine (S16) et à 20 mg (S17) après la deuxième stimulation antigénique avec un

vaccin polyvalent que chez les chiens non supplémentés. La concentration en Ig M n'a pas été différente entre les lots d'animaux.

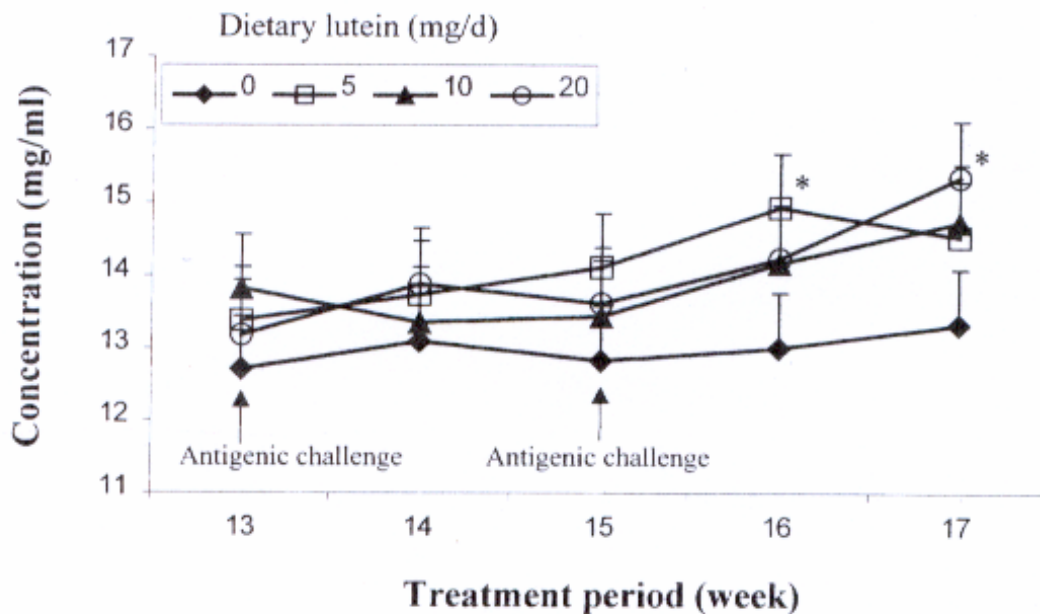


Figure 15. Evolution de la concentration plasmatique en Ig G de chiens nourris quotidiennement (depuis S0) avec 0, 5, 10, 20 mg de lutéine, de la semaine 13 à 17 de la période d'enrichissement (d'après KIM *et al.*, 2000).

Tous les animaux ont reçu une injection d'un vaccin polyvalent aux semaines 13 et 15.

Les conclusions de CHEW *et al.* (2000, c) vont dans le même sens. La concentration en Ig G a été plus forte chez les supplémentés aux semaines 1, 2, 4 et 8 (20 mg de β -carotène), par rapport au groupe témoin. Les plus fortes différences de concentration entre les chiennes supplémentées et celles qui ne le sont pas, ont été obtenues entre les semaines 2-4, ce qui pourrait signifier un effet transitoire de la supplémentation.

Tous les résultats expérimentaux de ces études s'accordent sur l'existence d'une association favorable entre l'alimentation et une meilleure réponse immunitaire cellulaire. Pourtant, après stimulation du système immunitaire avec du PWM stimulant les cellules de type B, des résultats contradictoires ont été obtenus. Les populations cellulaires de type B sont positivement influencées d'après KIM *et al.* (2000, a) mais pas d'après CHEW *et al.* (2000, c).

Par contre, quelles que soient les doses utilisées, ni la supplémentation en lutéine, ni celle en β -carotène, ont un effet significatif sur la population cellulaire B CD 21+.

Malgré ces résultats mitigés, la supplémentation en lutéine et en β -carotène semble avoir une influence sur la RIMH.

2.1.1.3. Influence de la supplémentation sur la sécrétion de cytokines

D'après CHEW *et al.* (2000, a) et KIM *et al.* (2000, c), la prise de lutéine et de β -carotène chez les beagles n'a eu pas d'influence sur la production d'interleukines II. Ce

résultat est surprenant, car cette molécule est impliquée dans les réactions d'hypersensibilités qui sont modifiées par une supplémentation alimentaire. L'IL2 joue aussi un rôle important dans la prolifération des cellules mononuclées sanguines périphériques. D'autres cytokines non encore étudiées interviennent-elles lors de ces phénomènes ou les conditions expérimentales reflètent-elles la réponse, *in vivo* ?

2.1.2. Le cas du chat


D'après **CHEW *et al.* (2000, b)**, la supplémentation quotidienne de 0, 0.4, 2 et 10 mg de β -carotène de l'alimentation de chattes n'a pas eu d'influence sur la prolifération lymphocytaire, l'HSR, la production d'Ig G et d'IL-2 après injection d'un vaccin polyvalent et de Con A. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec le chien.

Pourtant, il est possible de stimuler la réaction immunitaire féline, en particulier en utilisant d'autres caroténoïdes comme la lutéine. Nous allons discuter les résultats d'une étude de **KIM *et al.* (2000, b)** menée sur les effets de la supplémentation en lutéine du chat et insister sur les différences avec le chien. Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Effet de la supplémentation avec des doses de 0, 10, 15 mg de lutéine d'un échantillon de 56 chats âgés de 10mois, pendant 12 semaines, sur différents paramètres de la réponse immunitaire.

| | HSR (vaccin) | HSR (ConA) | PBMC (ConA) | PBMC (PWM) | PBMC (PHA) | CD 4+ | CD21+ | CD8+ | T | CMHII | IL 2 | Ig G |
|---------|-----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|----------|-------|------|---|-------|---------|---------|
| Lutéine | | 0 | | | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | |

PBMC : Prolifération des cellules mononuclées sanguines périphériques, T : Population des lymphocytes T, IL2 : Production plasmatique d'IL2, Ig G : Production plasmatique d'Ig G.

 Effet immunostimulant
0 Aucun effet

La supplémentation en lutéine stimule la RIMC (réponse positive à l'HSR à la suite de l'injection d'un vaccin, lymphoblastogenèse après stimulation antigénique avec la ConA et augmentation de la population T) et la RIMH (lymphoblastogenèse après stimulation par la PWM et augmentation des Ig G sans épreuve de stimulation antigénique). Contrairement au chien, le pourcentage de cellules B circulant est modifié par l'alimentation chez le chat.

Il semble que les réactions immunitaires cellulaire et humorale puissent être stimulées grâce à la supplémentation en lutéine et en β -carotène, chez le chien et le chat. Les populations cellulaires CD4+, CD8+ et de CMHII sont les plus influencées par la supplémentation en lutéine : celle-ci agirait sur l'expression fonctionnelle des marqueurs cellulaires. Cependant, les effets les plus marqués semblent s'exercer sur les cellules T. La réaction aux injections intradermiques peut en partie s'expliquer par l'augmentation des cellules présentatrices d'antigène de CMH II et par l'augmentation de la population des lymphocytes T. Les cellules T « helper », en particulier, jouent un rôle central dans la réponse immunitaire. De même, la plus forte lymphoblastogenèse chez les animaux supplémentés pourrait s'expliquer par une meilleure présentation des antigènes aux cellules effectrices de

la réaction immunitaire. Il en résulterait une meilleure communication entre ces cellules même s'il semble que les IL 2 ne soient pas impliquées dans ces mécanismes. Le système immunitaire du chat ne semble pas être aussi sensible à la supplémentation en β -carotène que celui du chien. Cependant, il ne faut pas conclure trop vite, à partir d'une seule expérience, à l'inefficacité d'une telle supplémentation. Les différences pourraient s'expliquer par les conditions expérimentales ou les paramètres de la réaction immunitaire mesurés.

2.2. Comment les antioxydants pourraient-ils agir sur la réponse immunitaire ?

Les mécanismes grâce auxquels les antioxydants agiraient sur le système immunitaire sont mal compris et beaucoup restent encore non élucidés. Nous allons présenter les différentes hypothèses qui ont été proposées.

2.2.1. Hypothèse I

Une des hypothèses est que les antioxydants participeraient au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules. Les radicaux libres sont des produits physiologiques de la réponse immunitaire. Lors d'infection, ils sont produits par certaines cellules de l'immunité comme les neutrophiles par exemple, pour tuer des bactéries pendant la phagocytose. Ces ROS peuvent alors avoir aussi des effets délétères sur les cellules. En particulier, ils peuvent peroxyder les lipides membranaires, induisant une modification de la fluidité membranaire. Par conséquent, la division et la prolifération cellulaire à la suite d'une stimulation antigénique est compromise, ainsi que les procédés de transduction membranaire de signaux (grâce auxquels les cellules communiquent). L'intégrité de la cellule est alors mise en jeu. De plus, l'expression des récepteurs membranaires pourrait aussi être altérée. Sous l'action des radicaux libres, l'ADN et les enzymes cellulaires pourraient aussi être endommagés. Les ROS affecteraient, enfin, la cascade de transduction du message cellulaire et l'expression des gènes. Tout cela conduirait à des dysfonctionnements, à des défauts dans la communication intra- et intercellulaire et, le plus souvent, à la mort de la cellule.

Un faisceau d'arguments va dans le sens de cette hypothèse. Tout d'abord, les cellules du système immunitaire sont plus riches en vitamine E que les autres cellules. Est-ce parce qu'elles en ont des besoins supérieurs aux autres cellules pour lutter contre la production de radicaux libres? De plus, leurs membranes sont très riches en acides gras poly-insaturés, ce qui les rend particulièrement sensibles au stress oxydatif. Enfin, la supplémentation alimentaire en divers antioxydants sur l'intégrité cellulaire a été étudiée chez des chats. **HARPER et al. (2001)** ont comparé l'aptitude des érythrocytes à résister à un choc osmotique. La résistance des cellules des chats supplémentés est supérieure à celle des chats témoins (Figure 17).

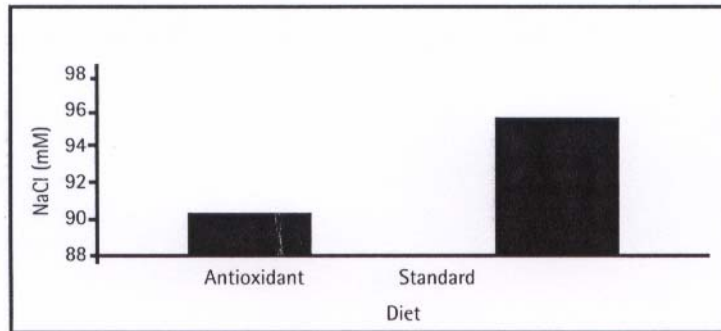


Figure 16. Concentration de NaCl pour laquelle 50% des érythrocytes de deux populations de chats (*Antioxydant* et *Standard*) sont lysés (d'après HARPER, 2001).

Les animaux du groupe « Antioxydant » sont supplémentés avec une alimentation enrichie en lycopène, des niveaux élevés de vitamine E, de β-carotène, de taurine et de lutéine. Ceux du groupe Standard sont nourris avec un régime standard.

Les antioxydants pourraient donc favoriser la réaction immunitaire en captant et neutralisant les ROS. Cependant, aucune preuve directe n'illustre, finalement, leur activité. D'autres études sont encore nécessaires pour arriver à comprendre ces mécanismes.

2.2.2. Hypothèse II

En dehors de ce rôle dans la prévention du stress oxydatif, les antioxydants pourraient être considérés comme des « immunonutriments » (Figure 18). Ils agiraient sur la production des cytokines ou sur celles des prostaglandines 2 (PGE2). C'est grâce à l'étude suivante que des chercheurs ont émis cette dernière hypothèse. D'après HAYEK *et al.* (2000), des chats supplémentés à 500 UI de vitamine E par kg de nourriture ont une production de PGE2 au bout de deux mois, significativement moindre que des chats non supplémentés. Or, la PGE2 est connue pour ses rôles immunomodulateurs dont les plus importants sont présentés dans le graphique ci-dessous. La vitamine E agirait-elle sur la production de cet eicosanoïde ? Ce mécanisme suffit-il à expliquer son influence sur la fonction immunitaire ?

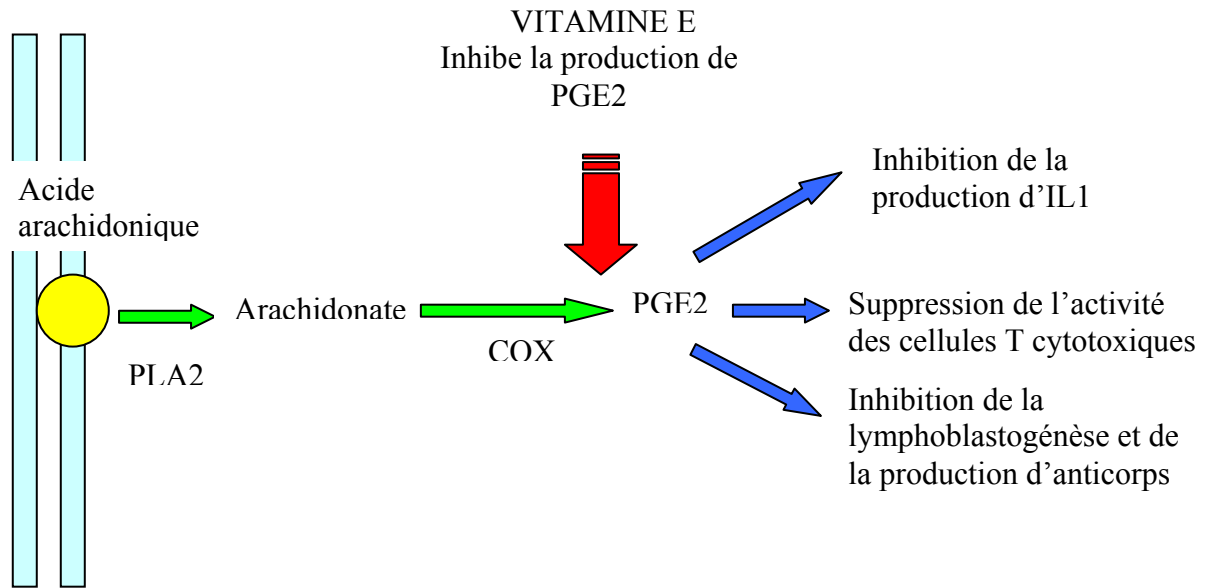


Figure 17. Rôle immunomodulateur de la vitamine E. Elle inhibe la production de PGE2 à partir de l'arachidonate. Ces PGE2 sont impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire.

2.2.3. Hypothèse III

Les molécules les plus utilisées pour renforcer la résistance de l'organisme sont la vitamine E et les caroténoïdes. La plupart des études se sont surtout intéressées aux propriétés immunomodulatrices de ces dernières et en particulier du β -carotène. Cependant, le rôle de molécules comme la lutéine, le lycopène, l'astaxanthine et la cantaxanthine est de plus en plus étudié car ces molécules semblent pouvoir aussi influencer la fonction immunitaire. Elles pourraient jouer un rôle dans la présentation de l'antigène. Par exemple, l'astaxanthine a une structure particulière. Elle possède des groupes polaires terminaux qui modifieraient la fluidité membranaire en augmentant sa rigidité, ce qui influe sur la présentation de l'antigène et donc la réaction immunitaire. La lutéine possède le même type de structure et pourrait agir de la même façon.

En ce qui concerne les mécanismes, beaucoup d'hypothèses existent mais peu de preuves expliquent le rôle des antioxydants sur la fonction immunitaire. Beaucoup de travaux sont encore nécessaires car, d'une meilleure compréhension de l'action de ces molécules, découlera une utilisation plus raisonnée et des effets mieux maîtrisés.

2.3. Intérêts de la supplémentation pour la santé animale

Plusieurs expériences ont permis de mettre en évidence le rôle bénéfique de l'utilisation des antioxydants dans l'alimentation du chien et du chat sur la réaction

immunitaire. Mais ces effets au niveau cellulaire se traduisent-ils réellement par un meilleur statut immunitaire de l'animal ?

2.3.1. Application à la vaccination : renforcer la RIMH grâce à la supplémentation

Deux semaines après l'injection d'un vaccin polyvalent et de son rappel, **KIM *et al.* (2000, a)** ont montré que la concentration en Ig G de chiennes supplémentées en lutéine est plus élevée que celle des non supplémentées. Leur organisme semble donc mieux répondre à une stimulation antigénique grâce à une production plus forte d'anticorps.

Les résultats des travaux de **HARPER *et al.* (2001)** vont dans le même sens. Un premier groupe de chat, noté A, a été maintenu pendant un an sous un régime supplémenté avec un mélange d'antioxydants (lycopène, vitamine E, β -carotène, taurine et lutéine). De la même façon, un deuxième groupe de chat, noté B, a été soumis à un régime supplémenté avec de l'huile de palme rouge, des vitamines C et E, du β -carotène, de la taurine et de la lutéine. Leur titre en anticorps anti-calicivirus est mesuré 7 jours puis 14 jours après leur vaccination. Les résultats sont présentés sur la figure 19.

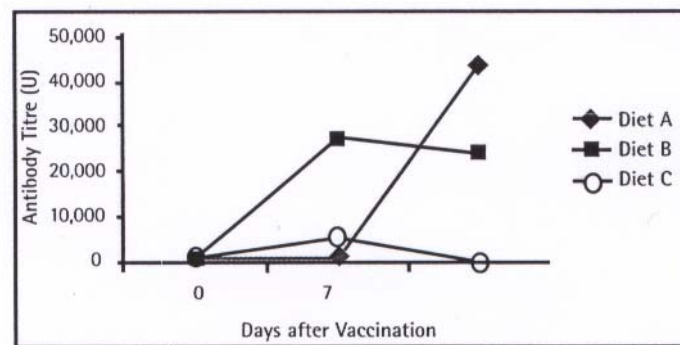


Figure 18. Titre anticorps en calicivirus félin après la vaccination annuelle de trois groupes de chats nourris avec un régime A, B et C (d'après HARPER *et al.*, 2001).

Le régime A est supplémenté en antioxydants : lycopène, vitamine E, β -carotène, taurine et lutéine. Le régime B contient de l'huile de palme rouge, vitamine C, E, du β -carotène, de la taurine et de la lutéine. Le régime C est standard.

Le même type de résultat a été obtenu avec des chiens par **HEATON *et al.* (2002, b)**. Un groupe de 20 chiens de races variées a été supplémenté pendant 16 semaines avec un mélange de vitamine C et E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène. Ces animaux ont produit plus d'anticorps neutralisant spécifiques contre la rage, 2, 4 et 6 semaines après leur vaccination. De plus, il semblerait que ces chiens atteignent plus vite un titre anticorps protecteur que les chiens non supplémentés.

Finalement, que ce soit chez le chien ou chez le chat, la supplémentation semble un moyen très intéressant de favoriser l'acquisition d'une immunité suffisante après la vaccination en permettant une plus forte production d'anticorps.

2.3.2. Application chez les chiots et les chatons : optimiser la primo-vaccination

La RIMH semble stimulée par l'emploi d'antioxydants dans l'alimentation mais ce titre plus élevé en cet anticorps est-il le reflet d'une plus forte capacité de l'organisme à réagir face à tous les antigènes possibles?

Les résultats des expériences menées par SMITH *et al.* (2000) et DEVLIN *et al.* (2000, a), chez des chiots de races variées, le confirment. Les titres en anticorps contre la parvovirose et l'hépatite de Rubarth ont été comparés chez des chiens supplémentés avec un cocktail d'antioxydants et des non supplémentés (Figure 20).

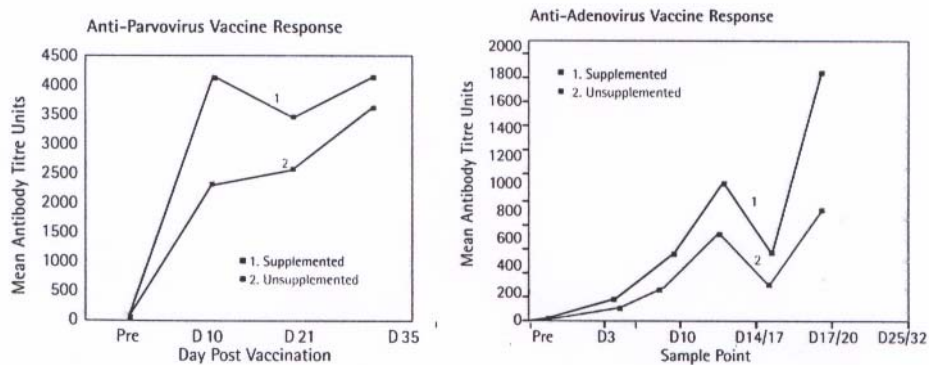


Figure 19. Evolution de la réponse en anticorps aux vaccins contre un adénovirus et un parvovirus chez des chiots supplémentés et non supplémentés (d'après SMITH *et al.*, 2000).

La figure 20 montre que la réponse des chiens supplémentés est plus forte et plus précoce que celle des chiens non supplémentés.

Le même type d'étude a été mené chez des chatons par KOELSCH *et al.* (2001) (Figure 21 et 22).

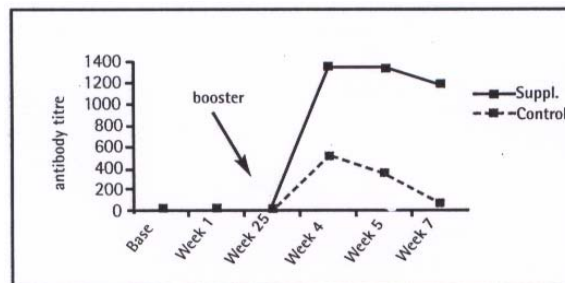


Figure 20. Evolution du titre en anticorps anti-herpès virus félin de deux groupes de chatons, l'un supplémenté, l'autre nourri avec un régime standard (d'après KOELSCH *et al.*, 2001).

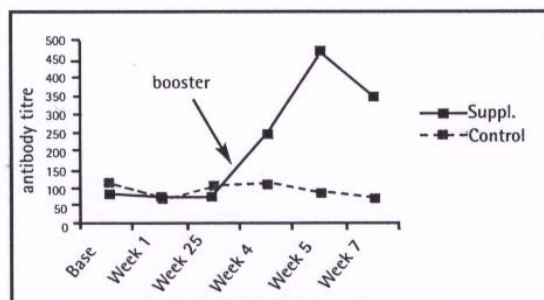


Figure 21. Evolution du titre en anticorps dirigé contre le virus de la panleucopénie de deux groupes de chatons, l'un supplémenté, l'autre nourri avec un régime standard (d'après KOELSCH et al., 2001).

La figure montre que les chatons supplémentés ont eu une plus forte réponse humorale contre l'herpès virus (ils ont un titre significativement plus élevé en anticorps que les non supplémentés à S7). Leur titre en anticorps anti-panleucopénie est aussi plus élevé. Par contre, aucune différence n'a été observé entre les deux groupes concernant le titre en anticorps contre le calicivirus. Grâce à la supplémentation, un niveau de protection supérieur pourrait être obtenu, face à certaines infections chez le chaton.

Les jeunes animaux sont des modèles intéressants pour l'étude du système immunitaire. En effet, la période du sevrage est un moment critique pour eux : ils n'ont pas encore une immunité tout à fait compétente et ne sont plus tout à fait sous la protection des anticorps maternels. Ils sont donc particulièrement sensibles aux infections. De plus, c'est à ce moment-là qu'ils sont soumis à toute une série de stress : la séparation de leur mère et de la portée, l'adoption dans une nouvelle famille, la première visite chez le vétérinaire... Or, il est prouvé que le stress a des effets immunosuppresseurs. Acquérir un système immunitaire performant est donc capital pour la santé de ces chiots et chatons. Beaucoup de facteurs peuvent influencer le statut immunitaire dont l'alimentation. Si la supplémentation en antioxydants pouvait permettre d'améliorer le statut immunitaire et d'optimiser la réponse vaccinale à cette période de la vie, ce serait une pratique à encourager. Une remarque importante concerne l'acquisition d'une immunocompétence chez les races géantes. En général, ces races répondent mal aux premières vaccinations. Cette particularité a été étudiée et semble avoir une composante génétique. La supplémentation serait donc particulièrement utile pour ces races là.

2.3.3. Application à l'animal âgé : ralentir le déclin de la réponse immunitaire liée à l'âge

2.3.3.1. Les conséquences du vieillissement sur la fonction immunitaire

Il est évident que les animaux âgés sont plus sensibles aux infections. Cela est attribué au déclin de la résistance du système immunitaire lié au vieillissement, phénomène bien documenté chez l'homme et les rongeurs. Nous allons présenter ici, les résultats expérimentaux concernant l'influence de l'âge chez les animaux de compagnie. Il est, en effet, intéressant de savoir quels paramètres sont influencés par le vieillissement pour savoir si la supplémentation est capable de les modifier.

L'immuno-sénescence canine a été étudiée sur trois groupes de chiens répartis par classe d'âge moyen de 2,4 - 5,8 et 9,1 ans par **GREELEY *et al.* (1996)**. Les effets du vieillissement ont été étudiés et les résultats expérimentaux sont les suivants :

- la prolifération lymphoblastique à la suite de la stimulation par la Con A, la PHA, la PWM et l'entérotoxine staphylococcique B, a été moindre chez les animaux âgés (les résultats de l'étude de **HAYEK *et al.* (2000)**, menée chez le chat, vont dans le même sens). La lymphoblastogenèse après injection de Con A, PHA a été plus forte, chez les jeunes animaux. Par contre, l'âge n'a pas exercé d'influence sur la réponse à la stimulation par la PWM. La PWM agit surtout sur la RIMH, donc c'est surtout la RIMC qui semble modifiée par l'âge.
- l'activité cytotoxique des cellules NK a augmenté.
- les titres anticorps après immunisation avec de l'hémocyanine (KLH) n'ont pas été modifiés.
- le pourcentage en cellules B a été diminué avec l'âge. Inversement le pourcentage total de cellules T, de CD8+ a été augmenté. Ces résultats sont différents de ceux de l'étude de **KEARNS *et al.* (2000)** qui ont mis en évidence un pourcentage des cellules B et T supérieur chez le jeune, avec un pourcentage de CD4+ diminuant avec l'âge et avec un pourcentage de CD8+ non influencé par le vieillissement. Bien que ces modifications induites par l'âge soient mal comprises, le pourcentage de cellules T augmenterait car le nombre absolu de ces cellules diminuerait moins vite que les autres.
- l'HSR à différents antigènes (Con A, PHA, PWM) est diminuée avec l'âge chez le chien, d'après **KEARNS *et al.* (2000)**.

En conclusion, ces expériences démontrent une diminution des performances de la fonction immunitaire avec l'âge. Les cellules T semblent les plus sensibles aux effets du vieillissement et en particulier les cellules CD4+. Ces lymphocytes T helper jouent un rôle central dans la communication entre les cellules de l'immunité via la sécrétion de cytokines. Cela pourrait avoir des répercussions sur l'activité des cellules B et expliquer la diminution de cette population. Si la supplémentation a des effets sur le système immunitaire du chien âgé, ces effets s'exercent probablement majoritairement sur la population T. Les dysfonctionnements de la réaction immunitaire liés à l'âge et, en particulier, ceux des cellules T expliqueraient l'incidence accrue des cancers et des maladies auto-immunes, chez les animaux vieillissants.

2.3.3.2. *Justification de l'intérêt de la supplémentation de l'animal âgé*

La diminution de la fonction immunitaire chez le chien âgé a été prouvée. Avoir un système le plus fonctionnel et le plus performant possible pour faire face au vieillissement est donc un enjeu pour l'animal. La fin de vie est une période critique au même titre que le sevrage comme nous l'avons vu précédemment.

L'influence de la supplémentation en β -carotène et de l'âge a été étudiée par **KEARNS *et al.* (2000)**, sur deux groupes de chiens. Le premier groupe était composé de 18 jeunes chiens : 9 Labradors d'âge moyen 1.5 ans et 9 Fox-terriers d'âge moyen 1.8 ans. Le deuxième était composé de 9 Labradors d'âge moyen 9.6 ans et de 9 Fox-terriers d'âge moyen 11.5 ans. Ils ont été soumis pendant 60 jours à deux types de régimes successifs : le premier supplémenté en β -carotène à une dose de 17.9 mg/kg d'aliment et le deuxième, à une dose de 43.7 mg/kg. Ce régime a eu une influence sur la population de cellules immunitaires :

- les vieux chiens fortement supplémentés ont eu une population T plus importante que les autres (chiens âgés des groupes de contrôle et faiblement supplémentés). Lorsque les

animaux âgés sont passés du régime faiblement supplémenté à celui fortement supplémenté, le pourcentage de LCD4+ et de CD8+ a augmenté.

- la proportion en cellules B n'a pas été affectée par l'alimentation, ni chez les chiens âgés, ni chez les plus jeunes.

La prolifération lymphoblastique à la suite de la stimulation antigénique par la Con A, PHA et PWM et les réactions d'HSR à la PHA ont été étudiées. La supplémentation en β -carotène a eu une influence bénéfique sur tous ces paramètres, chez l'animal âgé. Par contre, elle n'a eu aucune influence sur l'HSR avec un antigène spécifique comme les globules rouges de mouton.

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que certains paramètres de la fonction immunitaire étaient modifiés par l'âge : modification de la population lymphocytaire, diminution de la prolifération lymphoblastique après une stimulation antigénique donnée... Ces modifications semblent pouvoir être prévenues par l'utilisation de β -carotène.

L'étude de **DEVLIN *et al.* (2000, b)**, qui a eu pour but d'étudier les effets de la supplémentation en antioxydants sur la réponse immunitaire de chiens classés comme adultes et senior (Figure 23), confirme ces résultats.

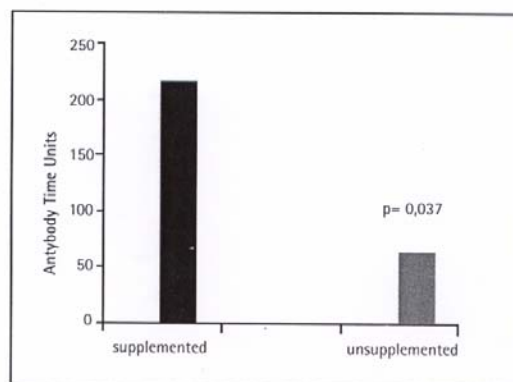


Figure 22. Comparaison des titres anticorps anti-adénovirus de deux groupes de chiens, après 6 mois d'un programme de supplémentation alimentaire (d'après DEVLIN *et al.*, 2000, b).

L'alimentation du groupe « supplemented » est enrichie en antioxydants, celle du groupe « unsupplemented » est standard.

Six mois après le dernier rappel de vaccination, le titre en anticorps anti-adénovirus a été statistiquement plus élevé chez les chiens supplémentés. Grâce aux antioxydants dans leur alimentation, la réponse de l'organisme s'est maintenue plus longtemps.

Enfin, d'après **HAYEK *et al.* (2000)**, la supplémentation alimentaire avec des doses de 250UI à 500UI de vitamine E par kg de nourriture, pendant deux mois, a entraîné une prolifération lymphoblastique à la Con A significativement plus forte chez des chats âgés supplémentés, par rapport à des chats âgés. Par contre, aucun effet de l'alimentation n'a été noté sur la lymphoblastogenèse après injection de PHA, et sur l'HSR, après stimulation avec la Con A et des globules rouges de mouton.

La population des cellules T est la plus modifiée par l'âge. Ces expériences suggèrent un rôle possible de la supplémentation pour empêcher les défauts liés à l'âge. Mais il reste à savoir si la supplémentation stimule l'action population T ou si elle agit en empêchant la diminution de cette population.

2.3.4. Application à l'animal sportif

Lors de la pratique d'un sport, l'organisme est soumis à un stress. Il peut s'en suivre une immunodépression susceptible d'augmenter la sensibilité de l'animal aux maladies, en particulier aux infections du tractus respiratoire.

D'après **CHEW *et al.* (2000, a)**, un exercice intense altère la population lymphocytaire sanguine du chien: on observe une augmentation des neutrophiles, une diminution des lymphocytes, des monocytes et des éosinophiles. La lymphoblastogenèse est significativement diminuée. Les « acute phase proteins » (APP) sont des protéines du sérum qui augmentent rapidement en réponse à une inflammation et/ou une infection. Elles sont augmentées avec l'exercice. Enfin, la population de cellules B est augmentée après 3 jours d'exercice, à l'inverse des cellules de CMH II qui est diminuée. L'exercice est sans effet sur les populations cellulaires CD3+, CD4+ et CD8+. Tous ces résultats suggèrent une immunodépression induite par la réalisation d'un sport.

Malheureusement, le programme de supplémentation des chiens de cette étude (21.7 mg de β -carotène, 18.4 mg de lutéine et 400 UI d' α -tocophérol) n'a pas réussi à empêcher ces modifications. L'ajout d'antioxydants a normalisé seulement quelques paramètres, c'est à dire qu'il a limité les modifications induites par l'exercice. Les effets sur l'APP, les TC et les cellules B ont été atténués.

De plus, les modifications de la fonction immunitaire induites par l'exercice ont été surtout visibles après 3 jours d'effort plutôt que dès le premier jour. La supplémentation serait-elle plus utile lors d'endurance que lors d'activité intense de courte durée ?

De nombreux arguments semblent confirmer l'intérêt de la supplémentation alimentaire en antioxydants pour accroître la résistance de l'organisme. Il s'agit en particulier du β -carotène et de la lutéine. Ils stimulent les acteurs de la réponse immunitaire et augmentent la réponse de l'animal vis à vis des antigènes extérieurs. Ils permettent de limiter le déclin de la réponse immunitaire lié à l'âge et de minimiser les dégâts causés par un stress comme par exemple lors d'un exercice intense. Ces effets semblent s'exercer souvent via la population des lymphocytes T. La supplémentation des carnivores domestiques pourrait donc jouer un rôle dans la prévention de maladies telles que le cancer où l'immunité humorale est impliquée.

3. Rôle des antioxydants dans différentes pathologies

3.1. Rôle des radicaux libres dans certaines maladies liées au vieillissement

L'incidence de certaines maladies augmente avec l'âge chez le chien et le chat. Il s'agit, en particulier de maladies dégénératives de l'animal vieillissant (comme la cataracte, les dysfonctionnements ostéo-articulaires, les problèmes cardiaques et les maladies neurodégénératives) et des maladies consécutives à des inflammations chroniques (comme certains cancers). De plus en plus de travaux, tendent à prouver l'implication des radicaux libres dans ces maladies au niveau des mécanismes d'entretien et d'aggravation. L'organisme âgé n'arrive plus à faire face à la production de ROS qui causent des dégâts sur les différents tissus. Les mécanismes réparateurs de l'organisme sont dépassés et les symptômes cliniques apparaissent. C'est principalement l'accumulation des lésions oxydatives tout au long de la vie qui est mise en cause. Or, un des sites des plus importants de leur production est la mitochondrie. Les chercheurs se sont donc intéressés à son implication dans les phénomènes de vieillissement.

3.1.1. Théorie radicalaire du vieillissement et rôle des mitochondries

Présentes dans toutes les cellules de l'organisme, les mitochondries ont un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cellulaire. Leur dysfonctionnement est impliqué dans l'apparition de maladies liées à l'âge car elles sont une source importante de production de ROS. Les mitochondries consomment 85% de l' O₂ utilisé par la cellule : les ROS sont des produits des réactions d'oxydoréduction nécessaires à la production d'ATP. Des radicaux libres peuvent s'attaquer :

- à l'ADN mitochondrial. Ces dommages oxydatifs peuvent causer des mutations de l'ADN et des dysfonctionnements cellulaires.

- aux protéines mitochondriales. Des lésions sur les enzymes sont à l'origine d'une perte de fonction de la mitochondrie. Elle n'est alors plus capable de produire de l'ATP. La cellule dispose de moins d'énergie pour faire face au milieu extérieur et elle est donc plus fragile.

- aux lipides. Leur peroxydation entraîne une diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire et donc une diminution de la capacité fonctionnelle de la mitochondrie. La synthèse d'ATP, dépendant, en particulier, d'un gradient de protons à travers cette membrane, se retrouve affectée.

Avec l'âge, les mitochondries fonctionnent de moins en moins bien. L'organisme est de moins en moins apte à lutter contre les effets des ROS. Les dégâts s'accumulent. Ils sont à l'origine de dysfonctionnements cellulaires qui, lorsqu'ils deviennent trop importants, sont à l'origine de maladies. Au cours de la vie, il serait donc intéressant de pouvoir éviter l'accumulation de ces lésions. Utiliser des compléments alimentaires permet-il de prévenir ou de stopper l'inévitable production de radicaux libres ? Nous allons étudier cette question à travers l'exemple de maladies où le stress oxydatif semble impliquer le rôle des antioxydants alimentaires.

3.2. Rôle des antioxydants dans les maladies neurodégénératives

Le chien est un excellent modèle d'étude de la maladie d'Alzheimer. Il peut développer en vieillissant, un syndrome appelé syndrome de dysfonctionnement cognitif canin (SDC) qui regroupe des troubles de l'apprentissage et de la mémoire. Les déficits cognitifs affectant l'animal âgé évoque ceux de patients humains souffrant de cette maladie. Les lésions oxydatives jouent sans doute un rôle important dans le développement de ces problèmes cérébraux, via la peroxydation des lipides et donc la dégénérescence neuronale. Des chercheurs ont étudié l'effet des antioxydants en prévention de l'apparition de ces troubles.

3.2.1. Comment agiraient les antioxydants dans le cerveau ?

Dans le cerveau, il existe une importante activité des enzymes de la chaîne respiratoire, générant de nombreux radicaux libres. Avec l'âge, les lésions sur l'ADN, les protéines et les lipides cellulaires s'accumulent. Comme les neurones sont des cellules particulièrement sensibles au stress oxydatif et qui ne se renouvellent pas, leur dysfonctionnement et leur dégénérescence pourraient être à l'origine des phénomènes de vieillissement et de maladies neurodégénératives.

Une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA) est l'accumulation de plaques séniles. Ce sont des dépôts extracellulaires contenant une protéine dite bêta-amyloïde (AB). Elle est formée par clivage enzymatique d'une protéine précurseur dite APP. Cette dernière est très sensible au stress oxydatif et, sous l'action des ROS, elle favorise la production de ces fragments amyloïdes. Ensuite, les AB peuvent propager le stress oxydatif en s'attaquant aux lipides et protéines cellulaires (Figure 24). La présence de ces dépôts protéiques est corrélée aux altérations des capacités d'apprentissage et de mémoire. Les antioxydants pourraient, donc, avoir des effets bénéfiques sur le vieillissement cérébral. Néanmoins, il faut encore comprendre les mécanismes de développement de ces maladies avant de développer des moyens thérapeutiques pour en prévenir et ralentir la progression.

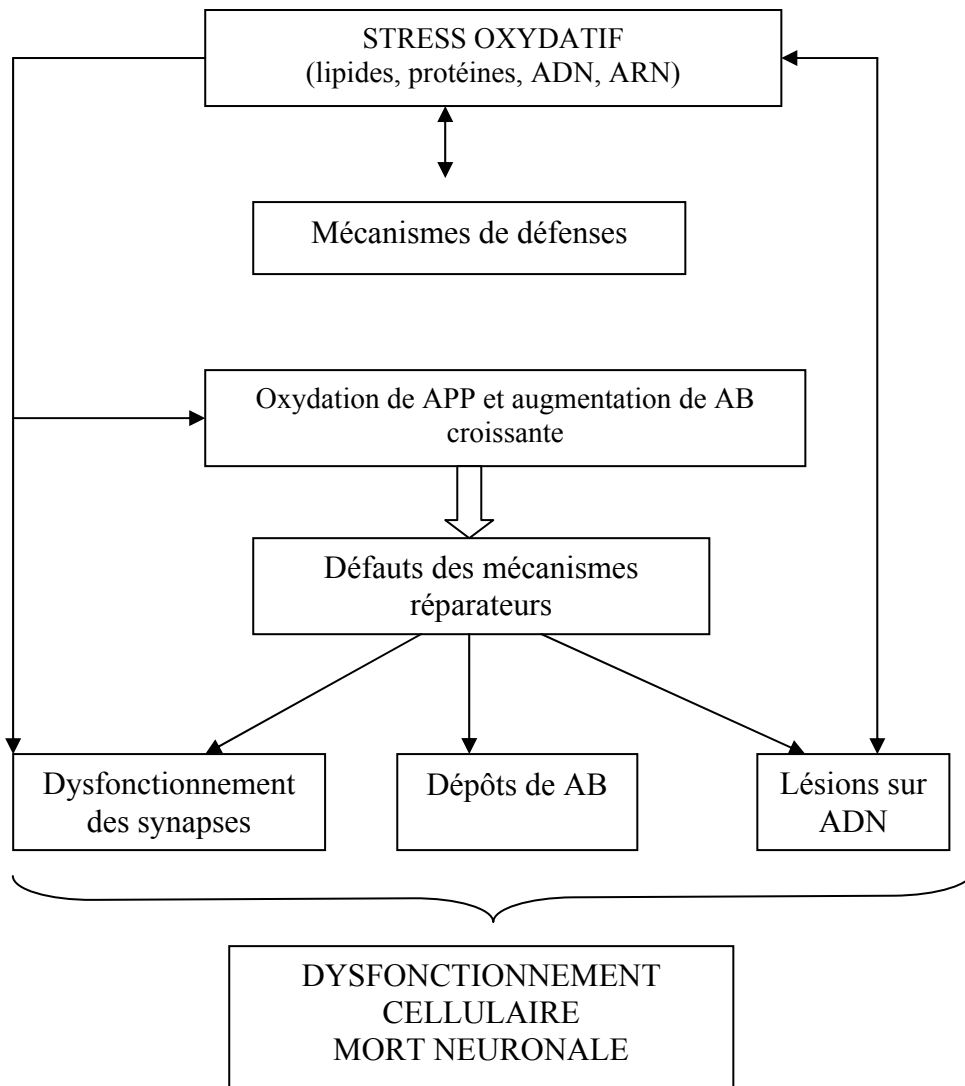


Figure 23. Le stress oxydatif et les protéines AB dans les phénomènes de mort neuronale (d'après COTMAN et al., 2002).

3.2.2. Expériences de supplémentation

Pour étudier l'utilité de l'emploi d'antioxydants sur le développement de maladies liées au vieillissement, leurs effets sur la mémoire et sur les facultés d'apprentissage ont été évalués. En particulier, deux types de mémoires semblent modifiés lors de la MA comme lors de SDC. Il s'agit chez le chien de :

- la mémoire spatiale (ex : se rappeler la localisation d'une récompense alimentaire),
- la reconnaissance d'objet (ex : capacité à reconnaître un objet vu quelques secondes auparavant).

MILGRAM et al. (2002, a) ont mesuré la mémoire spatiale chez le chien en plaçant une récompense alimentaire soit à droite soit à gauche d'un repère. Les animaux devaient apprendre à se situer par rapport au repère pour la trouver. Dans cet essai, les chiens âgés (8.05 à 12.3 ans) ont appris moins vite que les plus jeunes (1.95 à 4.5 ans), mais une

supplémentation de 14 jours avec un aliment enrichi avec des antioxydants (le supplément alimentaire contient en matière sèche : 1550 ppm de dl- α -tocophérol, 1095 ppm de taurine, 100 ppm d'acide ascorbique, l'inclusion de 1% de chacun des composés suivants : pulpe de citron, carottes, épinards, tomates et raisins, des cofacteurs mitochondriaux (L-carnitine 300 ppm, dl-acide α -lipoïque 150 ppm)) a permis de contrecarrer ces effets dû à l'âge.

Dans une autre étude, un groupe de 24 Beagles âgés (8.5 à 12.5 ans) et de 17 jeunes Beagles (1.95 à 4.9 ans) ont été soumis à deux types de régime alimentaire : le premier était pauvre en antioxydant, le second plus riche. Les différences de composition de ces deux régimes sont respectivement les suivantes : dl- α -tocophérol 120 ppm vs 1050 ppm, L-carnitine < 20 ppm vs 260 ppm, dl acide α lipoïque < 20 ppm vs 128 ppm, acide ascorbique < 30 ppm vs 80 ppm et 1% d'inclusion de chacun des composés suivants : épinards, tomates, raisins, carottes et pulpe de citron. Trois objets ont été présentés aux chiens : deux sont identiques. L'animal était récompensé chaque fois qu'il se dirigeait vers l'objet différent (**MILGRAM *et al.* (2002, b)**). Grâce à l'enrichissement pendant 4-6 mois, les performances des vieux chiens ont été améliorées.

Enfin, dans l'étude de **MILGRAM *et al.* (2001)**, deux groupes de beagles ont été utilisés : le premier était constitué d'animaux âgés de 10 à 13 ans, le second d'animaux de 3 à 5 ans. A l'intérieur de chaque groupe, une partie a reçu un aliment supplémenté en antioxydants (dont la composition n'est pas précisée) pendant un mois, l'autre non. Les animaux ont été soumis ensuite à des tests faisant intervenir leurs capacités d'apprentissage et leur vision dans l'espace. Les performances des animaux ayant consommé des antioxydants sont meilleures que les animaux témoins, dans les deux classes d'âge.

Les résultats de ces expériences sont donc en faveur du développement de la supplémentation en antioxydants dans le traitement des troubles cognitifs de l'animal âgé. Plus les épreuves sont complexes et plus les performances ont été améliorées dans le groupe supplémenté, comparativement au groupe témoin. Les antioxydants permettraient donc de protéger le cerveau du stress oxydatif et donc de ralentir voire de stopper la dégénérescence neuronale.

3.3. Rôle des antioxydants dans les maladies oculaires : la cataracte

Le stress oxydatif pourrait être impliqué dans la pathogenèse de la cataracte sénile. En effet, les cellules du cristallin sont constamment soumises à l'action des rayons lumineux, à l'origine de la production de radicaux libres. Les molécules à activité antioxydante, présentes en quantité importante dans l'épithélium du cristallin (SOD, CAT, GPx), et dans l'humeur aqueuse (acide ascorbique, α -tocophérol, carotènes, glutathion) constituent un mécanisme de défense suffisant le plus souvent pour les neutraliser. Cependant, avec l'âge, l'efficacité de telles défenses diminuent. De plus, les ROS, non pris en charge par les antioxydants, peuvent altérer les protéines et les lipides du cristallin. Une oxydation de ces molécules par les ROS ou les radiations lumineuses peut ensuite mener à une opacification du cristallin.

Plusieurs études montrent l'importance du statut antioxydant d'un organisme pour faire face à ces réactions d'oxydation impliquées dans le développement de troubles oculaires. **DAVIDSON *et al.* (1998)** ont mis en évidence, chez des chiens en chenil, un lien entre une alimentation déficiente en vitamine E et l'apparition de lésions oculaires. Des dégâts sur des

photorécepteurs, particulièrement sensibles aux réactions de photo-oxydation, ont été mis en évidence. La diminution de la concentration plasmatique en vitamine E liée à un défaut chronique d'apport alimentaire, expliquerait un défaut des mécanismes de réparation, des lésions accrues sur les membranes cellulaires et une accumulation de produits oxydés comme la lipofuscine dans l'œil.

Des études épidémiologiques chez l'homme comme la « Lens Opacities case control study », la « Nurse Health Study » et la « Baewer Dam Eye Study » ont mis en évidence une association entre une alimentation enrichie en antioxydants et un moindre risque d'apparition de la cataracte.

Enfin, **BARROS *et al.* (1999)** ont mesuré les valeurs de différents marqueurs du stress oxydatif chez des cockers atteints de cataracte. La concentration plasmatique du MAD est augmentée chez ces animaux, ce qui signe l'existence d'un stress oxydatif. La concentration plasmatique en acide ascorbique de ces animaux était diminuée. Or, la vitamine C est présente dans l'humeur aqueuse à des concentrations beaucoup plus élevées que dans le plasma. Si la concentration plasmatique diminue, il est probable que l'ascorbate se retrouve en quantité insuffisante dans l'œil. La vitamine C protégerait le cristallin et les autres tissus oculaires contre les dégâts induits par le rayonnement lumineux.

La concentration en vitamine C dans l'humeur aqueuse des oiseaux diurnes est supérieure à celle des oiseaux nocturnes. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'œil de ces derniers est moins soumis à l'action des rayons lumineux : il nécessite moins de vitamine C pour se protéger contre leur action délétère.

Ces différents facteurs pose la question de l'utilité de la supplémentation en vitamine C pour prévenir les lésions oxydatives au niveau oculaire.

En conclusion, il existe des arguments en faveur du rôle d'un stress oxydatif dans l'apparition de troubles oculaires dont la cataracte sénile. Certains antioxydants, en particulier les vitamines C et E, semblent être impliqués dans ces mécanismes, mais nous ne disposons toujours pas de preuves directes de l'efficacité d'une supplémentation dans ces nutriments.

3.4. Rôle des antioxydants dans les pathologies ostéo-articulaires

3.4.1. Production de radicaux libres dans les os

Deux maladies vont illustrer le rôle possible de la supplémentation en antioxydants : l'arthrite rhumatoïde et l'ostéo-arthrose. Les ROS semblent être des facteurs majeurs dans leur apparition et leur développement. Ils sont produits par trois mécanismes différents.

3.4.1.1. Production d'oxyde nitrique par les cellules de l'articulation

Les synoviocytes et les chondrocytes peuvent produire de l'oxyde nitrique (NO). En présence de superoxyde, NO peut être à l'origine de peroxy-nitrite hautement toxique. Ce radical peut causer une résorption osseuse. Ensuite, en milieu acide comme c'est le cas lors d'inflammation ou d'ischémie, le radical hydroxyle OH[°] est généré. Ce radical, très réactif, est à l'origine de dégâts cellulaires majeurs.

Tous les ROS produits peuvent engendrer des lésions sur les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Des enzymes peuvent être activées à la suite de dommages sur l'ADN. La PARS

(poly-ADP ribose synthétase), en particulier, intervient dans la régulation de certains gènes : elle stimule la production de NOS (NO synthétase) et de collagénase. Ces deux enzymes sont à l'origine de lésions dans l'articulation.

Tout se passe comme si, à la suite de la production de NO, une boucle de réactions auto-aggravantes était mise en place. La formation de NO peut aussi être causée par des cytokines (TNF α , IL 1 β). Ces molécules agissent en stimulant la production de NOS, enzyme inductible. Un résumé des principaux mécanismes faisant intervenir le NO est présenté ci-dessous (Figure 25).

Les actions de NO sur le métabolisme osseux sont variables. A de fortes concentrations, il a des effets antagonistes des PGE2 et inhibe la résorption osseuse, via la diminution de la croissance et le développement des ostéoblastes. A des concentrations plus faibles, il potentialise la résorption osseuse en agissant via les cytokines et joue donc un rôle essentiel sur l'activité ostéoclasique.

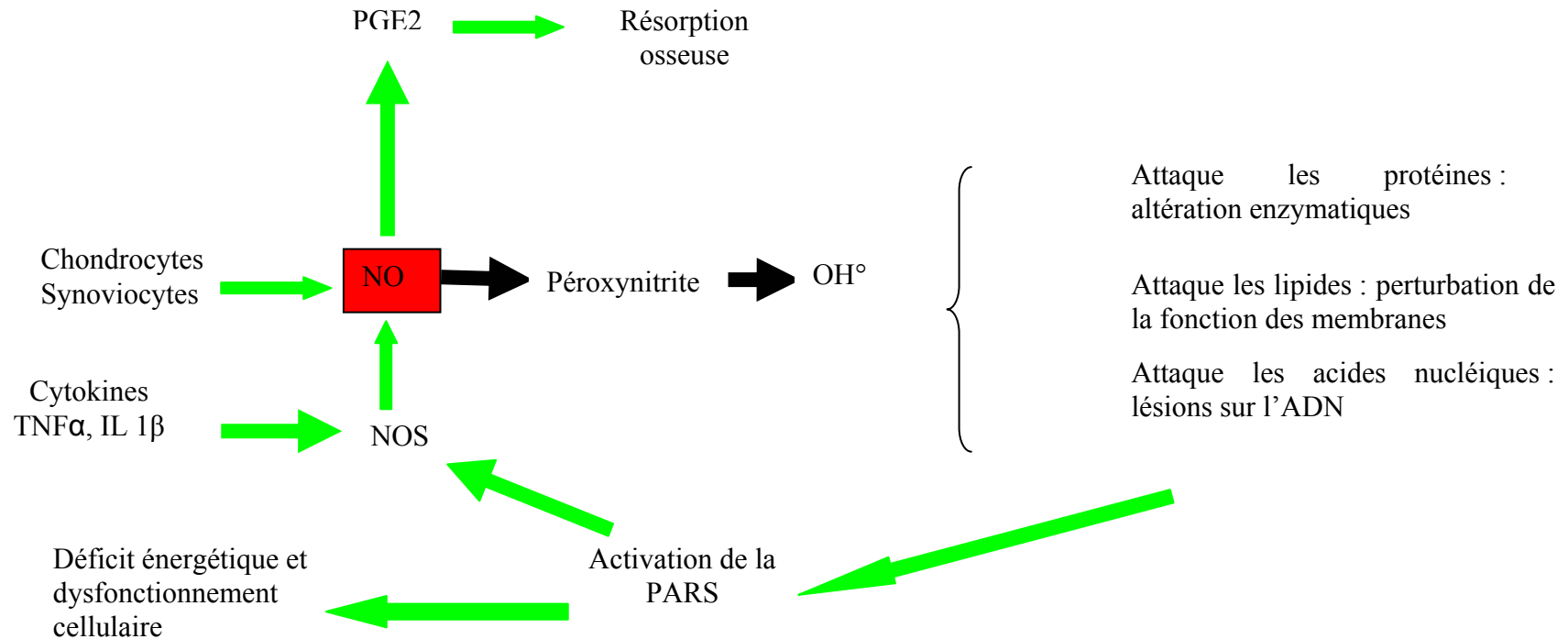




Figure 24. Rôle du NO dans l'apparition et l'entretien des lésions oxydatives au niveau osseux.

Les synoviocytes et les chondrocytes peuvent être à l'origine de la synthèse de NO. Ce dernier peut conduire à la production du radical OH° hautement toxique. Sa présence au sein de l'articulation est à l'origine de lésions sur les composants cellulaires. L'apparition de molécules oxydées conduit à la stimulation d'enzymes comme la PARS et la NOS, à l'origine de la mise en place d'une boucle de réaction auto-aggravante.

PARS : Poly-ADP-ribose synthétase, NOS : NO synthétase, NO : Oxyde nitrique.

 Stimule
 Cause la formation

3.4.1.2.

Production de radicaux libres par les ostéoclastes

Les ROS sont aussi le produit de l'action des ostéoclastes. Pendant la résorption osseuse, les ostéoclastes produisent et libèrent localement des enzymes lysosomiales, des protons et des radicaux libres pour dissoudre les minéraux et dégrader la matrice osseuse.

3.4.1.3.

Production de radicaux libres lors des processus inflammatoires

Une troisième voie de production de ROS dans l'os fait intervenir les cellules responsables de la phagocytose : les macrophages activés et les polynucléaires neutrophiles. Lors des processus inflammatoires, ces cellules peuvent produire des radicaux superoxydes, hydroperoxydes et hydroxyles.

Finalement, dans l'os, il existe de nombreuses sources de ROS. Ces radicaux peuvent causer des effets délétères au niveau de l'articulation. De plus, les mécanismes qui régissent leur production sont assez complexes et entraînent la mise en place d'une succession de réactions le plus souvent aggravante.

3.4.2. Expériences de supplémentation

Une expérience a été menée par **WATKINS *et al.* (2000)**, sur des chiots de race Coonhounds et âgés de 2 mois. Leur ration alimentaire contenait une quantité variable de graisses. Après traitement thermique, ces graisses étaient particulièrement oxydées. Ceci a permis de définir trois types de régime : faiblement oxydés (c'est à dire contenant moins de 50 ppm d'aldéhydes), moyennement oxydés (100 ppm d'aldéhydes) et fortement oxydés (500 ppm d'aldéhydes). Après 16 semaines de régime spécifique, des biopsies osseuses des crêtes iliaques de ces chiots ont été prélevées.

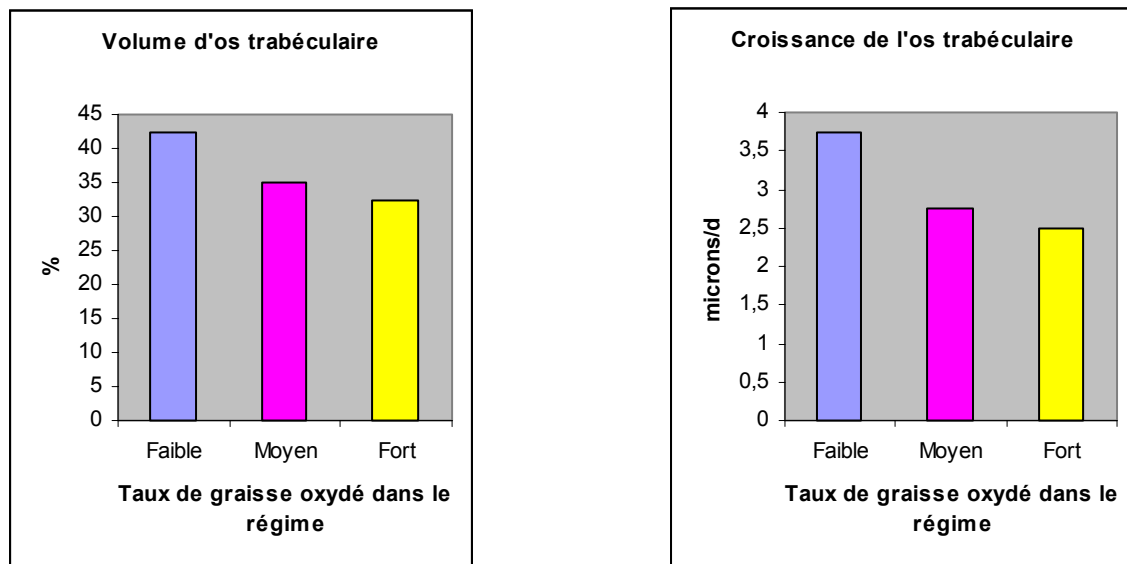


Figure 25. Effets de l'addition de graisses oxydées dans l'alimentation de chiots Coonhounds sur deux paramètres de la croissance osseuse. La figure de gauche montre une diminution du volume d'os trabéculaire. La figure de droite illustre la diminution de la croissance de l'os trabéculaire (d'après **WATKINS, 2000**).

La croissance et le volume d'os trabéculaire ont été plus importants lorsque l'alimentation était pauvre en acides gras oxydés (Figure 26). Une explication possible de ce résultat est que les molécules antioxydantes de l'organisme ont été détournées pour lutter contre l'apport supplémentaire de molécules oxydées et que, par conséquent, au niveau des articulations, les défenses antioxydantes ont été moins bonnes. Ces résultats semblent confirmer que les réactions d'oxydation jouent un rôle dans la « santé » de l'os. Les problèmes ostéo-articulaires seraient peut-être diminués si la formation de l'os était optimisée au cours de la vie de l'animal, d'où l'idée de compléter en antioxydants les aliments des chiens en croissance. Cela pourrait permettre d'atténuer l'activité ostéoclasique et donc de réduire la sévérité des maladies ostéolytiques de l'os et du cartilage.

Dix-huit chiens, âgés de 1 à 13 ans, présentant de l'arthrose secondaire à une dysplasie de la hanche, ont été étudié par **IMPELLIZERI *et al.* (1998)**. Les animaux ont été traités pendant 14 semaines avec un cocktail multivitaminé enrichi en bioflavonoïdes, en cystéine, en SOD, en vitamines E et A, en glutathion, en manganèse, en zinc, en sélénium et en extrait de foie dégraissé et desséché, commercialisé sous le nom déposé de PROANTHOZONEND. Un examen clinique a été effectué toutes les deux semaines. Les résultats de cette expérience montrent que les animaux sous traitement ont présenté moins de signes de douleur comparé au groupe placebo. Des mesures plus objectives de l'état des articulations, comme une étude du liquide synovial par exemple, auraient pu être utilisées, mais cette étude illustre déjà l'utilité de la supplémentation. Il convient de s'interroger maintenant sur les mécanismes d'action des antioxydants au niveau de l'os afin de justifier leur utilisation.

3.4.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Tout d'abord, les antioxydants lutteraient contre la production de ROS. Une expérience *in vitro* a été menée avec des cultures de chondrocytes issus de cartilage épiphysaire d'oiseaux. Le milieu était enrichi avec des acides gras et de la vitamine E. Le stress oxydatif a été induit par l'ajout de sulfate de fer. En supplémentant en vitamine E, la valeur des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et l'activité des lactates deshydrogénases (LDH) ont été diminués (le TBARS et l'activité des LDH sont des marqueurs du stress oxydatif : voir partie III. 2. 1.2.). La vitamine E permet donc une bonne protection contre le stress oxydatif. Enfin, lors de la même expérience, la supplémentation en vitamine a permis aussi de restaurer partiellement la synthèse de collagène et donc, de retarder la perte osseuse.

Les antioxydants agiraient aussi sur les cytokines. Comme nous l'avons vu chez le chien sportif, la vitamine E inhibe la production de PGE2. Les eïcosanoïdes sont connus pour leurs actions stimulantes sur les ostéoclastes. En diminuant la quantité de telles molécules, la vitamine E protégerait la formation de l'os et entraverait sa résorption (Figure 27).

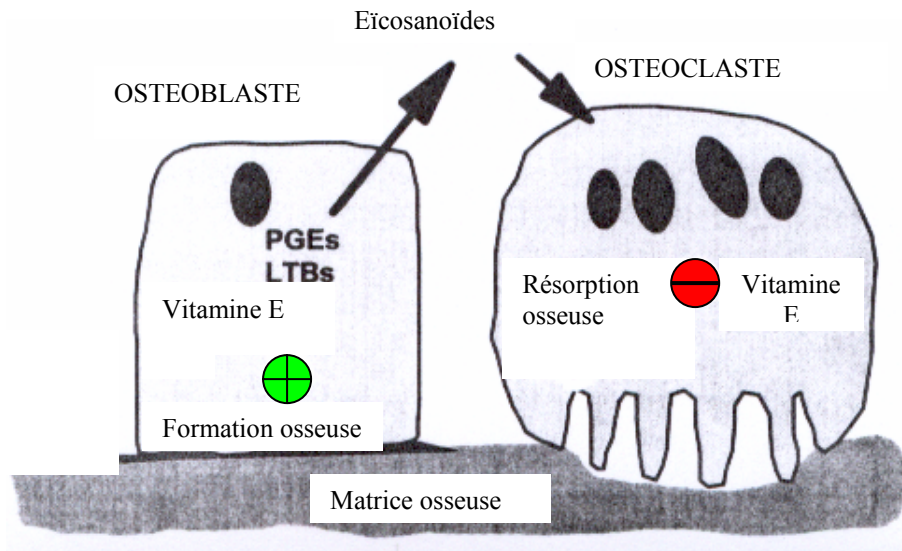


Figure 26. Effets de la vitamine E sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (d'après WATKINS, 2000).

La production excessive de prostaglandines favoriserait la résorption osseuse. La vitamine E, en modulant la production d'eïcosanoïdes (PGEs et leucotriène B (LTBs)), optimiserait la formation osseuse. Elle réduirait aussi la production de ROS par les ostéoclastes et ainsi inhiberait la résorption osseuse.

Dans le cas des maladies ostéo-articulaires, un faisceau d'arguments semble aller dans le sens de l'intérêt de la supplémentation en antioxydants. De nombreuses recherches doivent être encore réalisées afin de préciser leurs modalités d'action.

3.5. Rôle des antioxydants dans les maladies cardiovasculaires

3.5.1. Implications du stress oxydatif

Le chien est un modèle animal pour l'étude des troubles cardiaques chez l'homme. On dispose ainsi de données concernant les mécanismes du stress oxydatif au niveau du cœur, chez le chien. Nous allons illustrer, à partir de l'exemple de la cardiomyopathie dilatée canine, le rôle des ROS dans l'apparition et l'entretien des problèmes cardiaques.

L'étude de **CESSELI et al. (2001)** a consisté à induire une congestion cardiaque avec une surcharge volumique, en imposant un rythme rapide de contraction au muscle cardiaque, grâce à des électrodes. Au bout de 3-4 semaines, une augmentation du diamètre des cavités et un amincissement de la paroi du cœur sont apparues. Cela signe une souffrance cardiaque. Une des hypothèse expliquant le développement de défaillances cardiaques est la mortalité cellulaire consécutive à la présence d'un stress oxydatif. Une des conséquences de l'accumulation de ROS dans ces cellules est la nitroglycosilation des protéines. **CESSELI et al. (2001)** ont donc cherché à mettre en évidence la présence de nitrotyrosine dans les myocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes cardiaques pour voir si elle était corrélée à la mortalité cellulaire induite par la congestion cardiaque expérimentale. Ils ont

montré que la quantité de cellules contenant cette molécule augmentait proportionnellement avec le rythme imposé au cœur. Les stimulations cardiaques ont donc généré un stress oxydatif et la présence de ROS a altéré des protéines.

Les effets délétères du stress oxydatif se traduisent aussi sur l'ADN. Les ROS entraînent la formation de lésions sur l'ADN qui sont reconnus par une protéine, la protéine p53. Celle-ci est alors clivée en divers fragments à l'origine d'une succession de réactions menant à l'induction de l'apoptose. Les travaux de **CESSELI *et al.* (2001)** ont montré une augmentation globale des fragments de p53 avec l'induction expérimentale de la congestion cardiaque.

Ces attaques oxydantes sur les protéines et sur l'ADN sont à l'origine de mort cellulaire. Il semble logique que la perte de myocytes cause une diminution de la contractilité cardiaque, que la mort de cellules endothéliales entraîne des lésions au niveau des capillaires sanguins et une mauvaise oxygénation du tissu cardiaque et enfin que la diminution du nombre des fibroblastes soit à l'origine d'une diminution de la cohésion des différentes cellules et facilite la dilation du cœur.

Un mauvais fonctionnement de cet organe peut entraîner des altérations de la respiration mitochondriale et des modifications du métabolisme du calcium qui va s'accumuler dans les cellules. Ces phénomènes sont à l'origine de la production de ROS, en particulier de peroxy-nitrite ONOO⁻. Leur accumulation générerait un stress oxydatif et causerait une mort cellulaire, touchant les myocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes à l'origine de la détérioration de la fonction cardiaque.

En conclusion, les dommages oxydatifs semblent jouer un rôle dans l'évolution de maladies cardio-vasculaires. Les ROS semblent avoir des effets cytotoxiques par leur action sur les lipides, protéines et ADN, mais certains auteurs pensent qu'ils pourraient aussi agir en tant qu'agents inotropes négatifs.

3.5.2. Le statut antioxydant de l'animal est modifié en présence de troubles cardiaques

La quantité de molécules à activité antioxydante diminue dans le cœur soumis au stress oxydatif. Cela peut être lié à une augmentation de leur consommation locale pour faire face au stress mais signifie aussi une diminution générale des défenses de l'organisme face aux ROS.

Dans l'exemple de la cardiomyopathie dilatée chez le chien, les concentrations plasmatiques en vitamine A, E, C, les concentrations érythrocytaires de glutathion peroxydase et de superoxyde dismutase de 18 animaux souffrant de cardiomyopathie dilatée idiopathique et de 16 animaux non malades ont été mesurées afin d'évaluer leur statut antioxydant par **FREEMAN *et al.* (1999)**. La seule différence significative mise en évidence entre les deux lots, a concerné la glutathion peroxydase : sa concentration érythrocytaire est plus forte chez les chiens malades.

Par contre, la concentration plasmatique en MDA (malondialdéhyde : marqueur du stress oxydatif) des chiens présentant une cardiomyopathie dilatée n'est pas significativement différente de celle des chiens du groupe témoins. La question se pose de savoir si cette concentration plasmatique reflète la concentration myocardique en MDA.

De plus, cette étude a révélé que plus l'atteinte cardiaque était sévère, plus la concentration en vitamine E était faible (la sévérité de l'atteinte cardiaque est évalué en fonction de l'apparition ou non de signes cliniques lors de la pratique d'un effort physique). Cette molécule serait

consommée pour faire face à un stress important. Un des mécanismes proposés pour expliquer l'action de la vitamine E est son action inhibitrice sur la peroxydation lipidique. Les lipides peroxydés sont des inhibiteurs de la prostacycline synthétase artérielle. Or, la prostacycline est connue pour son activité anti-arythmique. En réduisant la peroxydation lipidique, la vitamine E contribuerait au maintien de la production de prostacycline et préviendrait les arythmies ventriculaires.

Le même type d'étude a été réalisé chez le chat par **FOX *et al.* (1993)**. Il a été montré que la concentration plasmatique moyenne de taurine était significativement plus basse chez les chats souffrant de cardiomyopathie dilatée que chez les sains : sa valeur correspondait à 38% de celle des chats sains. Le rôle de la taurine dans les troubles cardiaques est connu : la supplémentation de 0.15% de taurine par kg d'aliments secs a entraîné une concentration plasmatique de taurine supérieure à 50 $\mu\text{mol/l}$ chez les chats supplémentés qui ne développent pas de signes écho cardiographiques de problèmes cardiaques. Par contre, le mécanisme d'action de la taurine est mal connu. Elle participerait à la neutralisation de radicaux libres, mais en tant que petite molécule hautement chargée, elle jouerait aussi un rôle dans la régulation de la pression osmotique cellulaire et interviendrait dans la régulation de la concentration cellulaire en calcium.

D'autres études ont été menées sur le rôle de la taurine dans d'autres maladies cardiaques. Sur un échantillon de 220 chats :

- La concentration plasmatique moyenne en taurine des chats sains (n=120) est de 70 à 82 $\mu\text{mol/L}$,
- 15% des chats présentant une hypertrophie du ventricule gauche (n=28) ont une concentration plasmatique en taurine inférieure à 30 $\mu\text{mol/L}$,
- 27% des chats présentant une hyperthyroïdie (n=11) ont une concentration plasmatique en taurine inférieure à 30 $\mu\text{mol/L}$.

Enfin, la concentration du tocophérol tend à être inférieure chez les chats à cardiomyopathie dilatée. Ces études épidémiologiques soulignent l'importance de nutriments particuliers par rapport à certains problèmes cardiaques même si aucune relation de cause à effet n'a été encore mise en évidence, ni aucun mécanisme d'action élucidé.

Finalement, le stress oxydatif semble intervenir dans la genèse de troubles cardiaques. Une modification du statut antioxydant est souvent associée à ceux-ci. Sans preuve directe de l'efficacité des antioxydants dans la prévention et l'amélioration des maladies cardiovasculaires, il existe quand même quelques arguments en faveur de leur utilisation. Cela a conduit certains chercheurs à supplémenter certains animaux malades pour étudier leurs effets.

3.5.3. Effets de la supplémentation

En appliquant au cœur un rythme rapide via des stimulations électriques, il est possible d'induire des remodelages cardiaques. Un des premiers paramètres pouvant être modifié est la diminution de la période réfractaire de l'oreillette droite notée ERP. Pour mesurer celle-ci, deux électrodes ont été implantées dans le cœur de 11 beagles. Un rythme de 400 mouvements par minute a été appliqué au muscle cardiaque, par un pacemaker. D'après **CARNES *et al.* (2001)**, chez des chiens supplémentés avec 500 mg d'acide ascorbique en comprimé deux fois par jour, la diminution de l'ERP a été atténuée. L'ascorbate pourrait donc moduler les effets du remodelage électrophysiologique du cœur soumis à un stress.

De plus, avec le pacemaker, la valeur d'un marqueur du stress oxydatif comme la quantité de 3-nitrotyrosine dans l'atrium est significativement augmentée, alors que la concentration tissulaire atriale en ascorbate est significativement diminuée. La supplémentation en ascorbate a permis d'atténuer significativement ces modifications, c'est à dire l'augmentation de la présence de 3-nitrotyrosine et la diminution de la concentration atriale en ascorbate.

L'hypothèse de départ de cette expérience était qu'une relation de cause à effet existe entre la présence d'un stress oxydatif avec formation de peroxy-nitrite et les altérations cardiaques. La supplémentation en ascorbate permettrait de diminuer les dégâts induits par la présence de ONOO⁻ soit, en évitant son accumulation, soit, en préservant un statut antioxydant cellulaire efficace. Les mécanismes d'action sont encore mal compris. La supplémentation semble dans cette expérience avoir montré son utilité.

Dans une autre étude, 33 chats souffrants de cardiopathie dilatée du myocarde ont reçu une supplémentation orale avec 0.5 g de taurine cristallisée. Après deux semaines, tous les animaux ont présenté une amélioration de leur état (meilleur appétit...). Après 3-4 semaines, les effets positifs de la taurine ont été observés au niveau du myocarde : les paramètres échographiques comme la fraction de raccourcissement, le diamètre en fin de systole ont été améliorés par le traitement, 17 chats n'ont plus présenté de signes cliniques ni écho cardiographiques. Dans cette étude, la supplémentation a prouvé son intérêt.

FORRAT *et al.* (1997) ont étudié les effets d'une supplémentation orale de 500 mg d' α -tocophérol par jour, pendant trois mois, sur le fonctionnement cardiaque de 20 chiens (d'âge et de poids comparables : 18-2 kg). La contractilité myocardique a été mesurée et l'existence de troubles du rythme ventriculaire a été recherchée, après l'induction d'une ischémie de 20 minutes dans le muscle cardiaque, suivie de sa reperfusion pendant 150 minutes. Aucune différence significative n'a été décelée entre les groupes de chiens supplémentés ou non. Bien sûr, cette expérience ne suffit pas pour conclure sur l'inefficacité de la vitamine E. En tout cas, aucun effet néfaste ne résulte de son utilisation.

Le même type d'expérience a été mené par **SEBBAG *et al.* (1994)** avec quarante Beagles adultes supplémentés pendant deux mois avec 500 mg d' α -tocophérol par jour. Une ischémie du muscle cardiaque a été induite en réalisant l'occlusion de l'artère coronaire pendant 2 heures, suivie d'une reperfusion de 6 heures. La supplémentation a permis de prévenir le développement d'arythmies ventriculaires associées au phénomène d'ischémie-reperfusion. Par contre, la taille des infarctus sur le muscle cardiaque mesurée chez les survivants, a été supérieure chez les chiens supplémentés. Or, cette mesure de la taille des lésions est un indicateur pronostic important à long terme. La supplémentation aurait donc eu soit des effets bénéfiques soit délétères en fonction du paramètre considéré (c'est à dire si l'on s'intéresse soit aux arythmies soit à la mortalité cellulaire).

Ces résultats expérimentaux contradictoires ne permettent malheureusement pas de conclure quant à l'utilité de la supplémentation en vitamine E. L'utilisation de protocoles expérimentaux variés ou de doses de vitamine E différentes pourraient expliquer ces différences.

Il existe quelques arguments en faveur de la supplémentation en vitamine C chez le chien et en taurine chez le chat souffrants de cardiomyopathie dilatée. Mais, dans de nombreuses études, les résultats sont flous et les mécanismes mal compris. Il ne faudrait pas généraliser trop vite des résultats expérimentaux obtenus chez l'homme ou chez les rongeurs de laboratoire, aux chiens et aux chats. Des recherches doivent encore être menées pour

élucider les effets des antioxydants avant de proposer ces molécules dans le traitement et/ou la prévention de maladies cardiaques. La compréhension de leurs modes d'action est un véritable enjeu.

3.6. Le rôle des antioxydants dans les maladies chroniques : exemple du cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle. Son apparition est influencée par différents paramètres : toxiques, génétiques, alimentaires, environnementaux... Les radicaux libres interviennent à de nombreux niveaux de la carcinogenèse (Figure 28).

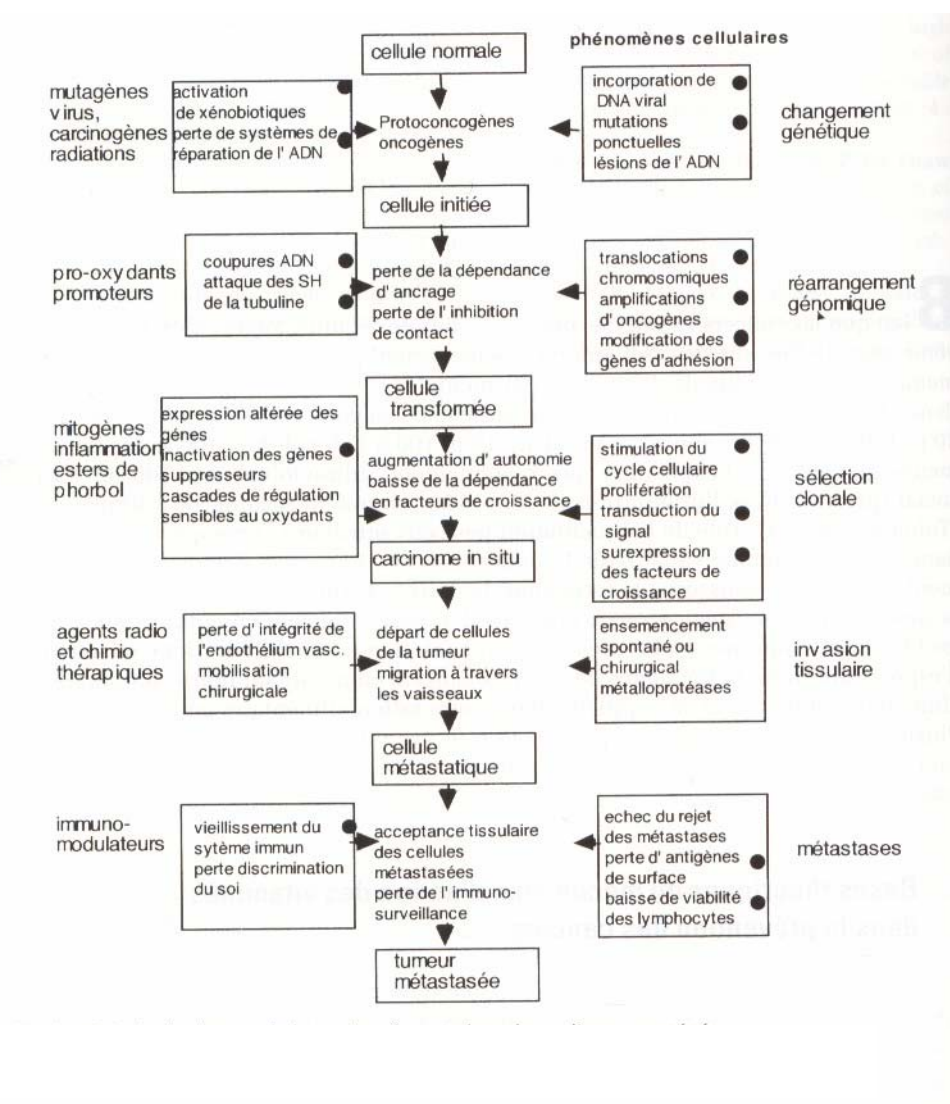


Figure 27. Principales étapes de la carcinogenèse et intervention des radicaux oxygénés (figurés par un rond noir) (d'après LE MOEL et al., 1998).

Cette constatation a conduit les chercheurs à s'interroger sur l'intérêt de la supplémentation alimentaire en antioxydants qui pourraient intervenir en :

- inhibant la conversion des molécules initiatrices procarcinogènes en carcinogènes sous l'action des radicaux libres et de mécanismes radicalaires,
- protégeant l'organisme des lésions de l'ADN,
- stimulant l'immunité anti-cancéreuse,
- jouant un rôle dans le contrôle de la prolifération et la mort cellulaire grâce à leur intervention dans la communication cellulaire.

Les relations entre l'emploi de molécules antioxydantes et la diminution de la fréquence de certains cancers ont été mises en évidence dans différentes études. Nous allons développer les différents arguments justifiant ou non leur emploi.

3.6.1. Arguments en faveur de l'utilisation des antioxydants

Plusieurs études épidémiologiques comme l'étude SU.VI.M.AX (supplémentation en Vitamines et minéraux antioxydants) ou « Nutritional Intervention Trials in Linxian » ont été menées chez l'homme. Elles ont montré que :

- le risque de développer certains cancers est inversement corrélé à la consommation de fruits frais et de légumes (sources de vitamines antioxydantes), et à des concentrations sanguines élevées en antioxydants.
- la supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants est intéressante pour diminuer l'incidence de certains cancers.

Ces divers travaux ont conduit les chercheurs à poser l'hypothèse séduisante du rôle potentiel des antioxydants dans la prévention des cancers. Qu'en est-il chez le chien et le chat ?

3.6.1.1. Protection vis à vis des lésions sur l'ADN

Tous les stress oxydatifs (les inflammations chroniques, ...) peuvent être à l'origine de dégâts sur l'ADN. Ces lésions ont des conséquences très importantes et qui contribuent au développement de nombreuses maladies. Des altérations des brins d'ADN entraînent des modifications de l'expression des gènes qu'ils codent et donc des dysfonctionnements cellulaires.

WATERS *et al.* (2003) ont étudié les effets de la supplémentation en sélénium sur l'existence de lésions de l'ADN et de l'apoptose sur des cellules épithéliales prostatiques, chez le chien. Le stress oxydatif serait impliqué dans la pathogenèse du cancer de la prostate et le sélénium, en tant que nutriment essentiel dans la constitution d'enzymes antioxydantes comme la GPx, pourrait jouer un rôle protecteur intéressant dans la lutte contre ce cancer. Quarante-neuf Beagles mâles non castrés, ne présentant aucune image histologique de lésions cancéreuses de la prostate au début de l'étude, ont été utilisés. Le groupe témoin (n=10) recevait un régime de base contenant 0.3ppm de sélénium. Le groupe supplémenté recevait ce même régime complété avec 3µg/kg ou 6µg/kg de poids vif par jour de sélénium pendant 7 mois. Chez les animaux supplémentés, le pourcentage de cellules prostatiques présentant des lésions sur l'ADN a été diminué et le nombre de cellules épithéliales prostatiques présentant des images d'apoptose a été augmenté. Cette expérience n'a pas mis en évidence une augmentation de l'activité plasmatique de la GPx après supplémentation. Les effets du sélénium seraient donc indépendants de l'activité de cette enzyme. Il conduirait les cellules

ayant des lésions de l'ADN à entrer en apoptose par des mécanismes encore mal connus et préviendrait, ainsi, leur transformation en cellules malignes.

HEATON *et al.* (2002, b) ont étudié le rôle des antioxydants dans la prévention des dommages sur l'ADN. Quarante chiens ont participé à l'expérience. Vingt d'entre eux ont été soumis à un programme de supplémentation de 16 semaines avec un mélange de vitamine C, de vitamine E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène (la composition précise n'est pas connue). Après 4 semaines de supplémentation, leurs concentrations plasmatiques en vitamine E et taurine ont été significativement augmentées comparativement au groupe témoin maintenu à un régime classique, ce qui confirme une augmentation du statut antioxydant du plasma et donc une meilleure aptitude de l'organisme à réagir au stress oxydant. Après 8 semaines de supplémentation, les lésions endogènes et exogènes de l'ADN, mesurées par la méthode du « Comet assay », ont été significativement diminuées (Figure 29).

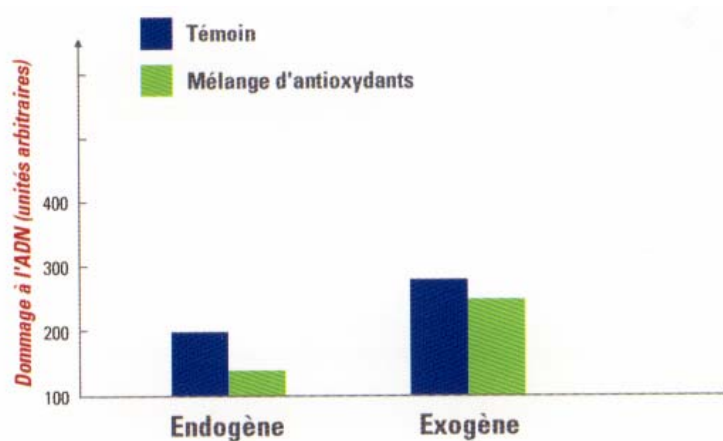


Figure 28. Lésions endogènes et exogènes subit par l'ADN, mesurées par « Comet assay », dans un groupe de chiens supplémentés avec un mélange de vitamine C, de vitamine E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène, deux mois après supplémentation. Les résultats exprimés sont des valeurs moyennes, $n=20$, les différences sont significatives à $P<0.005$. Les valeurs de départ étaient similaires dans les deux groupes (d'après HEATON *et al.*, 2002).

Ces résultats semblent démontrer l'intérêt de supplémenter l'alimentation en antioxydants pour faire face aux radicaux libres et empêcher la formation de mutagènes, mais leurs mécanismes d'action ne sont pas élucidés : augmentent-ils la stabilité de l'ADN (c'est à dire le protègent-ils contre les ROS) ou favorisent-ils sa réparation ?

3.6.1.2. Action sur l'immunité anti-cancéreuse

Les antioxydants peuvent stimuler le système immunitaire (*cf. Partie II. 2.*) Celui-ci comprend trois types de cellules capables de lutter contre les cellules tumorales :

- les macrophages
- les cellules « Natural Killer » (NK)
- les cellules T cytotoxiques.

La supplémentation en β -carotène parvient à stimuler la réponse de type cellulaire, impliquée dans la lutte contre les cellules cancéreuses (**KEARNS *et al.* (2000)**). Elle pourrait donc augmenter l'activité de ces trois types de cellules : celles-ci deviendraient, alors, plus efficaces dans la reconnaissance et la lutte contre les cellules tumorales.

3.6.1.3. *Action sur le contrôle de la prolifération et la mort cellulaire par leur intervention dans la communication cellulaire*

Les modifications de la membrane cellulaire sont fréquentes après action des radicaux libres, ce qui peut entraîner des troubles de la communication intercellulaire. Ainsi, certaines cellules se retrouvent isolées et peuvent échapper au contrôle des cellules environnantes, ce qui aurait un rôle dans le développement de cancer.

Nous avons vu en partie I que les radicaux libres intervenaient dans la régulation de l'expression de certains gènes. Il s'agit, en particulier, de gènes impliqués dans la multiplication cellulaire. En bloquant les chaînes de transduction de signaux cellulaires, les antioxydants pourraient, ainsi, inhiber la croissance tumorale.

3.6.2. **Arguments en défaveur**

3.6.2.1. *Intérêt des radicaux libres dans l'élimination des cellules cancéreuses*

Une augmentation de l'apport en vitamines n'est pas forcément anti-cancérigène. En effet, des tumeurs apparaissent chaque jour et le stress oxydatif est un moyen de lutte efficace contre celles-ci. Il agit, par exemple, en activant les polynucléaires neutrophiles qui attaquent les cellules tumorales.

Nous avons vu que les radicaux libres intervenaient dans la régulation de l'expression de certains gènes. D'après **PALMER *et al.* (1997)**, leur présence dans une cellule stimule les gènes de la réponse oxydative, c'est à dire ceux qui interviennent dans la défense de l'organisme contre le stress oxydatif. Les cellules sont donc plus aptes à lutter contre les ROS car leurs mécanismes de défenses sont, en quelque sorte, stimulés en réponse à la présence de ROS. La croissance cellulaire tumorale pourrait donc être favorisée en présence d'un excès d'antioxydants (fournit par l'alimentation), qui piégerait ces ROS nécessaires à la réalisation de cette boucle de rétrocontrôle. De la même façon, à faibles doses, les radicaux libres sont utiles car ils induisent l'apoptose, processus bénéfique qui protège contre le cancer. Les cellules endommagées comme les cellules cancéreuses se suicident. Un excès d'antioxydants favoriserait peut-être le développement de tumeurs.

3.6.2.2. *Variations des effets des antioxydants en fonction du stade de développement du cancer*

L'effet de la supplémentation en caroténoïdes sur le développement de cancer est fréquemment de prolonger la période de latence sans diminuer le nombre d'animaux atteints. Ces molécules seraient peut-être surtout efficaces lors de la phase de promotion de la cancérogenèse. D'après **ROTH *et al.* (1987)** : les antioxydants seraient utiles pour ralentir le

développement des tumeurs mais auraient moins d'intérêt dans la prévention de leur apparition.

3.6.2.3. Variations des effets des antioxydants en fonction du type de cancer

L'utilisation du β -carotène en supplémentation à des doses 2 à 6 fois supérieures aux besoins, est sans effet sur nombre de systèmes tumoraux, chez les animaux de laboratoires (Tableau 9).

Tableau 9. Effets de doses variées de β -carotène et de rétinol sur la tumorigenèse de certains modèles animaux (d'après MOON, 1989).

| DOSE DE BÊTA-CAROTENE mmol/kg de nourriture | FACTEUR CARCINOGENE | MODELE TUMORAL | OBSERVATION |
|---|---------------------|--------------------------|---------------------------|
| 18 | UV | Cancer de la peau/Souris | Inhibition |
| 2 à 6 | DMBA | T. mammaire/Rat | Inhibition |
| 4 | MNU | T. mammaire/Rat | Aucun effet |
| 4 | DEN | Poumon/Hamster | Aucun effet |
| 4 (+ 0.032 mmol/kg de rétinol) | DEN | Poumon/Hamster | Inhibition |
| 160 g/kg | DEN | Foie/Rat | Prolongement de la survie |

DMBA : 7, 12- diméthylbenz (a) anthracine

MNU : N-Nitrosométhylurée

DEN : N-Nitrosodiéthylamine

Le même type de résultats a été mis en évidence chez l'homme. Selon **HIRAYAMA (1979)**, une forte consommation de caroténoïdes est associée à une diminution du nombre de cancer de la prostate. Néanmoins, une telle relation n'existe pas dans le cas du cancer de l'estomac.

L'emploi de certains antioxydants n'a eu parfois aucun effet sur l'apparition de certains cancers, comme l'a montré l'étude de **HENNEKENS et al. (1996)**. En dehors de leurs effets antioxydants, ces molécules pourraient donc avoir des effets spécifiques encore inconnus pour expliquer cette action sur certains cancers. Il serait intéressant de les découvrir afin d'utiliser un antioxydant en fonction de la nature du cancer.

3.6.2.4. Effet négatif de l'utilisation des antioxydants : l'exemple du cancer du poumon dans une population de fumeurs

L'étude épidémiologique **(2)** a montré, chez l'homme, l'association entre la supplémentation avec de fortes doses de β -carotène (20 mg par jour) et l'augmentation de la fréquence d'apparition du cancer du poumon au sein des populations de fumeurs. D'autres études épidémiologiques telles l'étude ATBC (« Alpha Tocophérol and Beta-Carotene ») et

CARET (« Caroten And Retinol Efficacy Trial ») ont confirmé cette conclusion. Les chercheurs ont essayé de comprendre ces résultats qui remettraient en cause l'activité protectrice des caroténoïdes contre le cancer.

L'étude de **RUSSEL *et al.* (2004)** menée chez des furets supplémentés à doses variables de β -carotène et exposés à la fumée de cigarette, a permis d'élucider les mécanismes moléculaires. Dans une atmosphère riche en radicaux libres (comme c'est le cas dans le poumon exposé à la fumée de cigarette), le métabolisme du β -carotène est modifié : il conduit à la formation de dérivées potentiellement capables d'initier des réactions oxydatives. Ainsi, des métabolites du β -carotène comme le β -apo-14', β -apo-12', β -apo-10' et β -apo-8', isolés en quantité trois fois plus importantes dans des extraits de poumons de furets exposés à la fumée de cigarette que dans des extraits de poumons de furets non exposés, pourraient être des éventuels agents oxydatifs. Ceux-ci auraient, ensuite, une action inductrice sur les cytochromes P450, entraînant une diminution de la concentration en acide rétinoïque. Les mécanismes de communication cellulaire faisant intervenir par la suite l'acide rétinoïque seraient altérés. Il s'ensuivrait une cascade de réactions aboutissant à l'expression de gènes de la multiplication cellulaire et conduisant à la formation de lésions précancéreuses de métaplasie squameuse au sein du tissu pulmonaire. Cette expérience a permis d'expliquer le fait que des doses équivalentes à 30 mg/j de β -carotène pour l'homme, associées à une exposition à la fumée de cigarette, étaient néfastes.

Tous les furets supplémentés (n=6) avec une dose correspondant à 30 mg/j chez l'homme de β -carotène, sans exposition à la fumée de cigarette, ont aussi présenté des lésions de prolifération locale de cellules alvéolaires et de macrophages, même si les lésions les plus sévères de prolifération cellulaires et de métaplasie squameuse sont observés chez les furets exposés à la fumée de cigarette.

Par contre, une telle étude a aussi montré que l'utilisation de doses physiologique de β -carotène n'entraîne pas de tels effets. De plus, les lésions précancéreuses causées par l'utilisation de fortes doses de β -carotène et l'exposition à la cigarette, pourraient être prévenues par l'emploi concomitant de vitamine C et E, connues pour leur action inhibitrice sur les cytochrome P450.

Finalement, bien que le furet soit un modèle d'étude du métabolisme des caroténoïdes plus proche des humains que des carnivores domestiques, une telle expérience souligne l'importance de comprendre les mécanismes d'action des molécules antioxydantes avant de supplémenter à tort et à travers les animaux domestiques. Les doses de β -carotène doivent encore être définies pour éviter une action délétère sur l'organisme.

3.6.2.5. *Traitement anti-cancéreux*

De nombreux agents anti-cancéreux génèrent des radicaux libres pour lutter contre les cellules tumorales. En s'opposant à cette action, les antioxydants pourraient interférer négativement avec un traitement de chimiothérapie.

Leur utilisation n'est pas forcément contre-indiquée selon la nature des molécules de chimiothérapie utilisées. La production d'espèces libres oxygénées par l'adriamycine ou la doxorubicine, par exemple, n'est pas souhaitée et est sans doute responsable des effets secondaires indésirables obtenus par l'emploi de telles drogues, même si aucune étude ne l'a démontré de façon certaine. L'ajout d'antioxydants pourrait permettre de diminuer ces effets

secondaires, mais il convient tout de même de les employer prudemment lorsqu'une chimiothérapie est en cours car les mécanismes d'action sont encore mal compris. Leur emploi abusif pourrait aussi, être à l'origine de l'apparition de mécanismes de résistance des cellules tumorales aux anti-cancéreux. Avant de les utiliser, leurs mécanismes d'action doivent, donc, être complètement élucidés, afin d'éviter les erreurs.

Finalement nous ne disposons toujours pas de preuves directes de l'efficacité des antioxydants mais seulement d'un faisceau d'arguments qui semble confirmer leur utilité. Leur emploi doit rester prudent, car, dans certains cas, ils peuvent avoir des effets néfastes en thérapie ou en prévention anticancéreuse.

3.7. Rôle des antioxydants dans le diabète de type I et la prévention de la formation de corps de Heinz chez le chat

Nous nous intéresserons, en particulier au diabète de type I, chez le chat. La supplémentation pourrait avoir des effets thérapeutiques et protecteurs sur cette maladie. En effet, les dommages oxydatifs semblent jouer un rôle important dans la pathophysiologie de la maladie et dans ses complications : d'une part, l'auto-oxydation du glucose est à l'origine de ROS qui va agir sur les protéines, et, d'autre part, le statut antioxydant d'un animal diabétique est souvent compromis.

Une étude menée sur des chats diabétiques par **CHRISTOPHER *et al.* (1995)** a permis de mettre en évidence les manifestations du stress oxydatif. Les chats diabétiques, et particulièrement ceux ayant des corps cétoniques dans les urines, avaient :

- un nombre de corps de Heinz et des concentrations plasmatiques de glycohémoglobine plus élevées,
- une concentration sanguine en GSH réduit plus faible que celle des chats non diabétiques, ce qui reflète la détérioration du GSH par les réactions d'oxydation,
- une mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (marqueur de la peroxydation lipidique) augmentée chez les animaux malades, même si c'est de façon non significative.

Ces résultats illustrent l'implication du stress oxydatif dans le diabète. Ceci semble donc inciter à l'utilisation des antioxydants en tant qu'agents thérapeutiques, chez les chats diabétiques.

Dans l'espèce féline, l'hémoglobine, à cause de la présence de huit groupes sulfhydryles libres hautement réactifs, est très sensible aux attaques des ROS. Son oxydation conduit à sa dénaturation et à la formation de corps de Heinz, marqueur intéressant du stress oxydatif, *in vivo*. Chez le chat, beaucoup de causes sont à l'origine de la présence de ces corps de Heinz dont le diabète de type I : dans ce cas, des agrégats sont visibles au microscope sous la membrane interne des globules rouges. L'hémoglobine n'est plus fonctionnelle, l'érythrocyte perd ses capacités de déformation à cause d'une perte de sa fluidité membranaire et voit sa durée de vie raccourcie. Ceci est à l'origine de lyse globulaire et d'anémie hémolytique. Les antioxydants seraient-ils bénéfiques ou non dans la prévention et l'amélioration de cette anémie secondaire au diabète chez le chat diabétique ?

Des études de supplémentation ont donc été menées pour définir les molécules adéquates et leur utilisation. **ALLISON *et al.* (2000)** a étudié l'effet d'un stress oxydatif par

l'administration d'acétaminophène sur 45 chats en bonne santé. La supplémentation alimentaire avec 10mg de bioflavonoïdes par jour, pendant deux semaines, a amélioré l'aptitude des érythrocytes à résister au stress oxydatif. La quantité de corps de Heinz formée après le traitement oxydatif était moindre chez les chats supplémentés que chez les non supplémentés. Par contre, elle n'a eu aucun effet sur la méthémoglobinisation. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la méthémoglobinisation est une réaction plus rapide que la formation de corps de Heinz. Malgré les antioxydants, l'organisme est dépassé. La supplémentation en bioflavonoïdes pourrait donc être utile pour prévenir les dommages oxydatifs des globules rouges.

Par contre, d'autres études de supplémentation n'ont pas permis de mettre en évidence leurs effets sur le stress oxydatif (HILL *et al.* (2001, b)). L'ajout de 400UI d' α -tocophérol pendant deux semaines n'a eu que des effets minimes sur la formation de corps de Heinz, induite par l'administration de poudre d'oignon ou de propylène glycol, chez le chat. L'absence d'efficacité de la vitamine E peut s'expliquer par le fait qu'elle agit surtout au niveau des membranes plasmiques et que les chats présentant des corps de Heinz n'ont pas d'augmentation de la peroxydation lipidique au niveau de ces membranes. De la même façon, la supplémentation avec 250 mg d'ascorbate n'a pas eu d'action dans la prévention des effets du stress oxydatif.

Certains antioxydants ont un rôle et d'autres non. Il reste donc encore beaucoup de travail pour définir des plans rationnels d'utilisation.

Des maladies comme le diabète chez le chat mais aussi chez le chien, les maladies rénales chroniques, l'asthme chronique félin, sont caractérisées par la présence d'un stress oxydatif accru. L'utilisation des antioxydants pourrait être un plus dans leur traitement et leur prévention, mais pour le moment seules quelques études ont mis en évidence leur utilité. Rien n'est précis en ce qui concerne les doses, les durées de supplémentation, la ou les molécules à utiliser, leurs mécanismes d'action n'est pas encore défini.

Ces études de supplémentation ont permis de mettre en évidence certaines associations particulières entre la prise d'un antioxydant et un effet bénéfique pour la santé. Les résultats expérimentaux les plus probants concernent les effets des vitamines C et E, et des caroténoïdes sur la stimulation de l'immunité.

La vitamine E a aussi un rôle privilégié dans la prévention des maladies neurodégénératives, en tant qu'antioxydant majeur du SNC. Un lien entre la supplémentation en zinc et la maladie d'Alzheimer est en cours d'étude chez l'homme. Les résultats de ces travaux seront, peut-être un jour, transposables prochainement aux chiens pour traiter et/ou prévenir le SDC. Les expériences de supplémentation mettent aussi en évidence le rôle de la vitamine E dans les mécanismes de défense de l'organisme contre les dommages oxydatifs au niveau de l'os, ce qui justifie peut-être sa supplémentation.

Ensuite, la vitamine C et certains caroténoïdes semblent jouer un rôle important au niveau de l'œil. L'utilisation de la lutéine en particulier, vu les résultats obtenus chez l'homme, semble prometteuse.

Lors de cancer, selon le type de tumeurs, toutes les molécules antioxydantes ne semblent pas avoir la même efficacité, mais il convient de souligner l'intérêt du sélénium et du β -carotène dans certains cas.

Enfin, une association privilégiée existerait entre la taurine et certaines maladies cardiaques du chat.

Les recherches sur les mécanismes pathologiques faisant intervenir le stress oxydatif et l'utilité des antioxydants sont en plein essor. Face à la multiplication des résultats expérimentaux, il convient de garder un regard critique.

Mieux comprendre les mécanismes d'action des ROS dans les pathologies est un enjeu important. Pour éclaircir le rôle des antioxydants, les chercheurs doivent comprendre où les radicaux libres sont générés et comment ils apparaissent, au cours de la maladie. Comme nous l'avons vu avec l'exemple du cancer, l'emploi d'antioxydants peut avoir des effets néfastes. D'autres travaux sont donc nécessaires pour trouver les agents protecteurs les plus efficaces face à une maladie donnée.

PARTIE III : DISCUSSION DES TRAVAUX D'ETUDE SUR L'INTERET DE LA SUPPLEMENTATION EN ANTIOXYDANTS

1. Méthodes d'études

Pour mettre en évidence les effets de l'utilisation des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques et/ou le rôle du stress oxydatif dans l'incidence de certaines maladies, plusieurs types d'études sont possibles : les études d'observation et les études d'intervention. Il faut bien prendre en compte les défauts inhérents à chaque méthode avant d'interpréter les résultats obtenus.

1.1. Etude d'observation

1.1.1. Les études sur échantillon de population

Ce type d'étude est utilisé, par exemple, pour comparer les concentrations sanguines en antioxydants et/ou les risques d'apparition de pathologies oxydatives.

BAKER *et al.* (1986) ont mesuré les concentrations plasmatiques sanguines en différentes vitamines de 25 chiens censés être représentatifs de la population canine. Les résultats obtenus ont été différents de ceux de **SNOW *et al.* (1990)** qui se sont attachés à mesurer les concentrations plasmatiques de ces vitamines chez des Greyhounds. Cette différence s'explique du fait des particularités de l'échantillonnage de départ qui ont leurs caractéristiques propres (Tableau 10).

Tableau 10. Comparaison des concentrations en acide ascorbique, α -tocophérol et β -carotène dans deux échantillons de chiens (d'après SNOW *et al.*, 1990).

| | Acide ascorbique (mg/l) | α -tocophérol (mg/l) | β -carotène (μ g/l) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Echantillon de 25 chiens | 4 | 8 | 240 |
| Echantillon de Greyhounds | 5.3 | 10.4 | ND |

ND : Non détecté

Dans l'étude de **SNOW *et al.* (1990)**, les commémoratifs sur l'alimentation des 25 chiens n'étaient pas connus et peuvent avoir influencé les valeurs des concentrations. De plus, les Greyhounds constituent une population particulière soumis régulièrement à des exercices physiques intenses et à un régime alimentaire spécial. Les entraîneurs les supplémentent couramment en vitamines, espérant ainsi accroître leurs performances. Ensuite, dans l'échantillon de Greyhounds considéré, il existe des différences en fonction des chenils d'origine des chiens. Les animaux d'un chenil A couramment supplémentés en divers antioxydants dans leur alimentation quotidienne, ont présenté des concentrations en vitamines

supérieures à celles des chiens issus d'un chenil B où les animaux avaient un régime différent. Il n'est de ce fait pas possible de généraliser les résultats expérimentaux à toute la population canine à partir d'un seul échantillon : tout d'abord, celui-ci n'est pas forcément représentatif de cette population, ensuite, au sein d'une population, de grandes variations entre individus peuvent exister.

Avant de conclure sur la nécessité de supplémenter en antioxydants les carnivores domestiques, il convient donc d'être très critique vis à vis de l'échantillon d'animaux utilisé dans l'expérience. Il doit être de taille suffisante et être le plus représentatif possible de l'ensemble de la population.

1.1.2. Les études cas témoins

Il s'agit de comparer les apports alimentaires ou les statuts antioxydants de sujets malades et de sujets sains.

FOX *et al.* (1993) ont mis en évidence, chez le chat, une relation entre les faibles concentrations plasmatiques en quelques nutriments à activité antioxydantes (taurine, α -tocophérol, sélénium...) et la présence de maladies cardiaques acquises (cardiomyopathie dilatée, cardiomyopathie hypertrophique, myocardiopathies...). L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne démontre aucun lien de causalité. Dans notre exemple, est-ce la faible concentration en taurine des chats souffrant de cardiomyopathie dilatée, qui est la cause ou la conséquence de la maladie ? Deux hypothèses peuvent expliquer les résultats. Premièrement, les chats développent des troubles cardiaques qui sont la cause d'un stress oxydatif à l'origine de la consommation de molécules antioxydantes comme la taurine. Ou alors, le déficit en taurine peut rendre l'organisme moins apte à lutter contre la production de ROS, il s'ensuit un stress oxydatif à l'origine de la cardiopathie. Ce type d'étude n'établit pas de relation directe entre des paramètres spécifiques. Elle insiste sur des corrélations qui nécessitent de plus amples recherches. Il peut s'agir d'association fortuite. En aucun cas il n'est possible de conclure sur un mécanisme d'action. De plus, certains chats ont des cardiopathies avec une concentration plasmatique en taurine normale et d'autres ont des concentrations faibles sans troubles cardiaques. Ceci illustre que d'autres facteurs de risque peuvent intervenir. Ils ne sont pas mis en évidence à la suite de ces études cas témoins.

HINCHCLIFF *et al.* (2000) ont montré qu'il existait une corrélation statistiquement significative entre la concentration plasmatique en isoprostanes et le logarithme de l'activité de la CK dans le sérum. La peroxydation des lipides induite par le stress oxydatif dû à l'exercice intense serait à l'origine de lésions sur les membranes des cellules du muscle squelettique, de la rupture de celles-ci et de la libération de leur contenu cellulaire. Cette explication va dans le sens de notre hypothèse selon laquelle il existe un stress oxydatif dans le muscle durant une activité physique. Mais il est également possible qu'un facteur extérieur autre que le stress oxydatif soit à l'origine de la libération des CK et des isoprostanes de façon tout à fait indépendante. De la même façon, ils ont démontré l'existence d'une corrélation entre la diminution de la concentration plasmatique en vitamine E et l'augmentation de l'activité de la CK dans le sérum et de la concentration plasmatique en isoprostanes. Cependant, aucun lien de cause à effet entre la concentration en vitamine et ces deux marqueurs du stress n'a été encore démontré. Les mécanismes intervenant dans le muscle soumis à un effort doivent encore être éclaircis. Il s'agit de prouver que le stress oxydatif intervient dans la genèse de dégâts importants dans le muscle pour savoir si une supplémentation avec des antioxydants serait justifiée, voire efficace.

Même si de nombreuses études établissent un lien entre les dommages musculaires à la suite d'un exercice et la production de ROS, d'autres mécanismes que le stress oxydatif, pourraient intervenir dans le muscle. La mise en évidence d'une corrélation statistique ne signifie pas qu'il existe un lien de causalité.

1.1.3. Les études prospectives

Des sujets sains sont suivis au cours du temps jusqu'à ce qu'ils développent des troubles particuliers. Ce type d'étude cherche, par exemple, à mettre en évidence un risque diminué d'apparition d'une maladie sur des animaux dont les apports alimentaires sont riches en antioxydants ou dont le statut antioxydant est élevé au départ de l'expérience.

Pour approfondir le syndrome de dysfonctionnement cognitif canin, une étude longitudinale sur les effets d'une approche diététique sur les fonctions cognitives des beagles a été menée par **MILGRAM *et al.* (2001)**. Trois objets dont deux identiques ont été présentés aux animaux. Pour obtenir une récompense, ils devaient reconnaître celui qui était différent. Les chiens âgés (autour de 10 – 13 ans) soumis au régime enrichi depuis 6 mois avec des antioxydants ont commis moins d'erreurs que les chiens âgés non supplémentés. Le risque d'apparition des troubles cérébraux serait-il plus important chez ces animaux dont l'alimentation n'est pas enrichie ?

Le problème est que personne ne sait si les sujets à l'entrée de l'étude ne présentaient pas déjà un risque plus élevé de développer une maladie, et avait un statut antioxydant déjà plus faible au départ ou des apports alimentaires plus riches.

1.2. Les études d'intervention

Les études d'intervention comprennent particulièrement les expériences de supplémentation. Ces études peuvent être menées sur des sujets en bonne santé ou présentant déjà des antécédents de maladies.

Les apparentes contradictions des résultats obtenus entre les différentes expérimentations peuvent être dues à différentes causes :

- les résultats ne sont pas comparables entre les études car les populations ne sont pas comparables. L'expérience de **KEARNS *et al.* (2000)** a montré que supplémenter neuf chiens de deux races différentes et d'âges variés (Labrador et Fox terriers) avec du β -carotène a permis de stimuler leur lymphoblastogenèse. Ces résultats contredisent les travaux de **CHEW *et al.* (1998)** menés sur des femelles Beagles adultes, qui n'ont montré aucun effet du β -carotène sur la prolifération lymphoblastique. Le désaccord de ces résultats semble être du à des méthodologies différentes. Il faut prendre en compte la race, le sexe et l'âge des animaux.

- les sujets d'étude peuvent déjà au départ être déficients : par exemple mal nourris, ou avoir un mauvais statut antioxydant...

- les méthodes expérimentales peuvent différer dans le choix de la dose d'antioxydant à utiliser, du rythme d'administration, de l'association de diverses molécules.

Il faut bien se garder de généraliser hâtivement les conclusions à partir des résultats d'une seule expérience.

En conclusion, il faut rester critique devant les résultats obtenus, quel que soit le type d'étude et garder bien à l'esprit les inconvénients de chaque méthode. C'est pour cela aussi,

qu'à partir de quelques études de supplémentation et de quelques mesures du statut antioxydant des animaux, il n'est pas facile de conclure sur l'utilité de ces derniers.

2. Méthodes de mesures

Parfois des résultats contradictoires entre deux études peuvent être attribués à l'emploi de méthodes expérimentales différentes.

Prenons l'exemple de l'étude sur l'influence de l'âge sur le statut antioxydant du chat. D'après CHARLTON *et al.* (2000, c), aucun effet de l'âge n'a été mis en évidence sur la concentration des enzymes à activité antioxydante comme la catalase. Pourtant, en mesurant la concentration érythrocytaire de la catalase féline par la méthode de Aebi, CHARLTON *et al.* (2000, e) ont mis en évidence un effet de l'âge. Il est donc impossible de conclure sur l'influence du vieillissement sur la concentration en catalase chez le chat. Selon les protocoles expérimentaux choisis, les conclusions peuvent être différentes.

Quelles méthodes choisir alors, pour étudier les effets de la supplémentation en antioxydants chez les carnivores domestiques ? Comment faire pour approcher le rôle des antioxydants dans l'alimentation du chien et du chat ? Il faudrait avoir un marqueur du stress oxydatif permettant d'apprécier les effets de la supplémentation. Le problème est d'en trouver un représentatif de ce qui se passe dans l'organisme, de définir ensuite une méthode analytique sensible et spécifique et de définir, enfin, des valeurs normales. L'exercice n'est pas simple. Cet outil permettrait aux nutritionnistes, aux épidémiologistes et aux cliniciens de travailler sur le rôle des ROS dans les processus pathologiques et de mesurer les effets des antioxydants dans la prévention des maladies où ils sont impliqués. Beaucoup de méthodes différentes existent à ce jour. Il convient donc de s'interroger sur les avantages et les inconvénients des différentes techniques mises à notre disposition.

Deux grands types de méthodes de mesure sont utilisés : la mesure des concentrations des produits des réactions d'oxydation et celle des défenses de l'animal contre les radicaux libres. Elles permettent d'évaluer les lésions engendrées par les ROS et la résistance de l'organisme.

2.1. Mesures des produits des réactions oxydatives

Il s'agit de détecter les produits et les sous-produits des dommages induits par les ROS. Ceux-ci sont à l'origine de la peroxydation des lipides, des lésions sur l'ADN et de l'oxydation des protéines. Une évaluation *ex-vivo* du stress oxydatif est le plus souvent réalisée à partir de mesures sur des échantillons sanguins. Le problème se pose de savoir si les mesures sur sérum sont représentatives de ce qui se passe *in-vivo* ?

2.1.1. Les lésions sur l'ADN

Les dommages subis par l'ADN sont évalués grâce à une méthode récente : le « Comet assay », technique d'électrophorèse. Les cellules utilisées sont des leucocytes très sensibles aux dommages oxydatifs : d'une part, à cause de la richesse de leur membrane plasmique en AGPI et d'autre part, car la production de ROS fait partie de leur fonctionnement normal. Etre capable de mesurer les produits finaux des réactions d'oxydation est utile pour déterminer les effets de la supplémentation sur ce marqueur du stress oxydatif

du chien et du chat. D'après **HEATON *et al.* (2002)**, ce procédé a présenté de nombreux avantages. Peu de cellules sont nécessaires. Ce test est sensible pour détecter de faibles lésions sur l'ADN. Il est facile à mettre en œuvre et peu coûteux.

Un autre outil est la méthode ELISA utilisant le 7,8 dihydro-8-oxo-2'déoxyguanosine (8-oxodG) comme marqueur des lésions sur l'ADN. Plus les lésions sur les brins de chromatides sont importantes, plus sa concentration est élevée. Ce marqueur a notamment permis de montrer l'efficacité de la supplémentation avec des antioxydants pour augmenter la résistance de l'animal sportif aux dommages oxydatifs.

2.1.2. Les lésions sur les lipides

Il s'agit, en particulier de mesurer les lésions des lipides consécutives à la peroxydation de ces derniers. Plusieurs méthodes sont disponibles. Les principales sont les suivantes:

- la mesure des diènes conjugués (DC),
- l'utilisation du matériel réactif à l'acide thiobarbiturique (TBARM),
- les chromolipides fluorescent (FC).

Nous allons présenter rapidement le principe de chacune et leurs caractéristiques majeures.

La technique de DC consiste à extraire les lipides du sérum et d'analyser par spectrophotométrie les lipides peroxydés.

Le principe de la TBARM consiste à mélanger un échantillon de sérum avec une solution d'acide thiobarbiturique, le TBA. Plusieurs produits terminaux de la peroxydation lipidique comme des aldéhydes réagissent avec le TBA. La peroxydation lipidique peut ainsi être détectée dans le plasma par la mesure des substances réactives avec ce TBA. Une molécule est dosée en particulier : le malondialdéhyde (MDA). L'absorbance de la solution est ensuite mesurée et permet d'évaluer les dommages oxydatifs.

La méthode des FC consiste à mesurer la fluorescence d'un échantillon de sérum. Les chromolipides fluorescents sont des composés inactifs formés par réaction des aldéhydes (produits terminaux de la peroxydation lipidique) avec des groupes aminés libres.

Deux types de technique s'opposent : la FC et la TBARM contre la DC. Les deux premières méthodes mesurent les produits terminaux des réactions de peroxydation. Par contre, la DC rend plutôt compte d'événements précoces. Elle serait donc moins affectée par la fonction protectrice des antioxydants. Les effets compensateurs des mécanismes antioxydants n'ont pas le temps de se mettre totalement en place par rapport à la TBARM et la FC qui mesurent les produits finaux des réactions. Elle serait donc la plus sensible des trois méthodes pour estimer la peroxydation des lipides. Par contre, une critique est souvent formulée contre cette technique : d'après **VAKANSARI *et al.* (1995)**, elle surestimerait les dégâts sur les lipides car des diènes conjugués sont produits lors de réactions autres que la peroxydation lipidique.

La TBARM serait une mesure peu spécifique de la peroxydation lipidique. Des antioxydants, des molécules contenant du fer... réagissent et altèrent facilement la réaction avec le TBA. Malgré cela, le MDA est fréquemment utilisé. Cet aldéhyde cytotoxique, capable de léser l'ADN et les protéines cellulaires, est considéré comme un bon marqueur du stress oxydatif.

D'autres méthodes de détection et de quantification de la peroxydation lipidique existent.

Il est possible de doser les alcanes (comme l'éthane et le pentane) dans les gaz respiratoires. Malheureusement, ces molécules sont rapidement métabolisées *in vivo*, ce qui diminue la précision de la mesure.

Les isoprostanes, produits de la peroxydation de l'acide arachidonique des membranes cellulaires, peuvent être mesurés dans le plasma et les urines par HPLC ou ELISA (cette dernière méthode est plus difficile à mettre en oeuvre). Leur concentration tissulaire est directement proportionnelle au degré de stress oxydatif.

Des résultats expérimentaux contradictoires sont obtenus en fonction de la méthode utilisée. Des études récentes suggèrent d'utiliser l'allantoïne, forme oxydée de l'acide urique, ou le glutathion disulphide, forme oxydée du glutathion, comme marqueur du stress oxydatif *in vivo*. Il convient de bien connaître les limites, les avantages et les inconvénients de chaque technique analytique avant de déterminer un protocole expérimental.

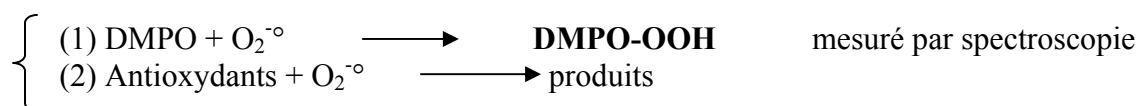
2.2. Les mesures des défenses contre les radicaux libres

2.2.1. Mesures de l'activité des enzymes antioxydantes

Une autre façon d'étudier le statut antioxydant d'un organisme est d'évaluer l'activité des enzymes intervenant dans la protection contre le stress oxydatif : la SOD, la CAT et la GPx.

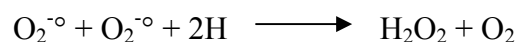
La SOD joue un rôle important dans les mécanismes de défense de l'organisme. La mesure de son activité pourrait être un marqueur intéressant. Cependant, plusieurs formes de SOD existent chez les mammifères et elles ne varient pas de la même façon lors de stress oxydatif. Quelle est, alors, l'isoenzyme la plus spécifique des réactions d'oxydation se déroulant dans l'organisme ?

Selon **SATO *et al.* (2003)**, la SOD riche en manganèse (Mn-SOD) serait particulièrement intéressante à évaluer. L'objectif de son expérience était de mettre en évidence le lien entre l'activité antioxydante et plusieurs maladies du chien : le cancer, les maladies inflammatoires et hépatiques, grâce à la technique du ESR (Electron Spin Trapping). Un réactif, le DMPO, a été utilisé pour doser le $O_2^{\cdot-}$ dans le plasma de chiens malades. Le principe est celui du dosage par différence selon :



Dans le milieu réactionnel, les deux réactions (1) et (2) sont en compétition. La mesure par spectroscopie des produits de la réaction (1), connaissant la quantité initiale de DMPO introduit par l'expérimentateur, permet de doser la quantité d'antioxydants présents initialement dans le milieu et ayant piégé le $O_2^{\cdot-}$.

Cette technique permet d'évaluer la participation des antioxydants pour piéger le $O_2^{\cdot-}$. Or, la SOD participe à la protection contre les effets de $O_2^{\cdot-}$ en catalysant la réaction suivante :



L'amplitude du signal en spectroscopie des chiens malades (en particulier de ceux souffrant de maladies hépatiques et inflammatoires) a été plus petit que celui des chiens sains. Le signal recueilli étant lié au statut antioxydant et à la présence de SOD, ce dosage permet d'évaluer indirectement son activité. Une augmentation de la SOD dans les tissus peut signifier de meilleures réactions de défenses du chien.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet aussi, de différencier les diverses SOD : la SOD contenant du manganèse et la SOD extracellulaire. Cette dernière enzyme est inhibée en présence de cyanure de potassium (KCN). L'ajout de KCN dans le milieu réactif permet donc de faire la différence entre les activités dues à chacune des enzymes et d'étudier le rôle de diverses molécules antioxydantes dans les différentes maladies. Les résultats expérimentaux ont montré que seule l'activité de la SOD insensible au KCN, la Mn-SOD, était significativement augmentée dans le plasma des chiens malades. Il semblerait donc que la détermination de l'activité de cette isoenzyme soit la plus intéressante dans le diagnostic des maladies liées au stress oxydatif. L'activité de capture de $O_2^{\cdot -}$ semble influencée par l'âge, ce qui complique l'interprétation. De plus amples recherches doivent donc être menées avant de diffuser cette technique.

La catalase pourrait aussi servir de marqueur du stress oxydatif. Maintenant, il est possible de doser son activité dans les globules rouges du chien et du chat. Des méthodes ont été validées par CHARLTON *et al.* (2000, d) et CHARLTON *et al.* (2000, e) qui ont défini des valeurs usuelles moyennes, chez le chat et le chien.

De la même façon, la mesure de la glutathion peroxydase est intéressante. CHARLTON *et al.* (2000, g) et CHARLTON *et al.* (2000, c) ont utilisé sa concentration sanguine comme indicateur du statut antioxydant. De plus, celle-ci reflète la quantité de sélénium présent dans l'organisme. Cette mesure est donc aussi intéressante pour évaluer indirectement la teneur de l'organisme en cet oligo-élément et estimer si une supplémentation est nécessaire.

2.2.2. Mesures des antioxydants non enzymatiques

Les vitamines (vitamines C, E, β -carotène, lutéine, lycopène, taurine...) sont considérées comme un important moyen de résistance de l'organisme face au stress oxydatif. Différentes méthodes de dosages existent. Les valeurs usuelles de leur concentration plasmatique sont déjà définies, ce qui permet d'une part, de savoir si leurs valeurs de base peuvent être augmentées par la supplémentation et, d'autre part, d'observer les modifications de leur concentration en cas de stress, donc de leur implication comme antioxydant.

Le problème est de savoir si les concentrations plasmatiques reflètent les concentrations tissulaires et si leurs modifications ont une réelle conséquence pour la santé de l'animal. Par exemple, la vitamine E, liposoluble, a une concentration plus importante dans les tissus. Son dosage plasmatique ne donne, donc, qu'une approximation de son importance dans l'organisme. Par contre, elle est transportée dans le plasma à l'aide des lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en cholestérol. Il est donc intéressant d'associer la mesure de la vitamine E dans le plasma ou le sérum avec celle de la concentration en cholestérol pour avoir un dosage plus précis.

Inversement la vitamine C est hydrosoluble, ce qui rend la mesure de sa concentration plasmatique plus représentative des stocks de l'organisme. Par contre, le problème est qu'elle est synthétisée de façon endogène par le chien et le chat et donc sa mesure ne permet pas de mesurer les effets de sa supplémentation.

Finalement, chaque vitamine est un cas particulier. Si l'on veut avoir une estimation précise de leur concentration pour apprécier leur rôle dans la lutte contre les ROS, il faut bien connaître leur métabolisme, prendre en compte tous les facteurs de variations de leur concentration avant de définir les besoins vitaminiques puis évaluer les effets de la supplémentation sur le stress oxydatif. Bien que ces concentrations plasmatiques ne soient pas nécessairement une estimation correcte du statut tissulaire, elles sont faciles à déterminer. Il est donc nécessaire de savoir les interpréter.

2.2.3. Mesures des concentrations des enzymes piégeant les métaux de transition

La mesure de la ferritine, protéine de stockage du fer de haute affinité, peut être intéressante. Elle maintient le fer sous forme liée en prévention de sa participation sous forme d'ion ferreux à la réaction de Fenton à l'origine de la production de ROS. Une méthode de dosage par ELISA a été développée chez le chien. Elle présente une bonne répétabilité. Une valeur usuelle a été définie de 371,62 +/- 102,85 ng/ml, par **SKINNER *et al.* (1999)**. Cette enzyme reflète bien le statut *in vivo* en fer de l'organisme.

2.2.4. Mesures du statut antioxydant total (TAS)

Le principe de ces mesures repose sur le fait que le nombre des différents antioxydants dans le sérum et les tissus est si important qu'il est difficile d'évaluer chaque composant séparément. Plusieurs méthodes de mesures ont donc été développées pour estimer l'aptitude d'un échantillon à neutraliser les radicaux libres. Elles reposent en général sur un dosage par différence. Un échantillon dont le statut antioxydant est à mesurer, est ajouté à un système générateur de ROS. Des antioxydants sont consommés pour inhiber l'action des ROS, l'activité antioxydante mesurée dans le système est donc diminuée. Cette diminution permet d'estimer le statut antioxydant. Deux manières de mener ces mesures sont employées :

- soit le temps pendant lequel se déroulent les réactions d'oxydation est fixé et c'est le degré d'inhibition qui est mesuré,
- soit c'est le degré d'inhibition qui est fixé et c'est le temps mis pour l'atteindre qui est calculé.

Cependant nous verrons qu'une technique existe (Oxygen Radical Absorbance Capacity : ORAC) combinant la mesure de ces deux paramètres.

Nous allons maintenant présenter par ordre décroissant d'importance les différentes techniques utilisables, leurs avantages et leurs inconvénients.

La première des méthodes est l'« Oxygen Radical Absorbance Capacity » (ORAC). Sa sensibilité et sa spécificité en font une méthode de choix pour quantifier la capacité des antioxydants à neutraliser les ROS. D'après **CAO *et al.* (1995)**, elle est particulièrement intéressante car elle mesure à la fois le temps et le degré d'inhibition des réactions de peroxydation induites par le système générateur de ROS. De plus, elle prend en compte l'action de nombreux antioxydants. Ainsi, l'activité de l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, du β -carotène et de l'acide urique (inhibant totalement les réactions de peroxydation) est prise en compte dans la valeur du statut antioxydant total. Notons, cependant, que cette valeur sous-estime l'activité du GSH, de l'albumine et de la mélatonine qui n'inhibent que partiellement ces réactions. Enfin, c'est une méthode de choix car elle permet de différencier l'activité de certains antioxydants de la phase aqueuse de celle des antioxydants liposolubles. Il est aussi possible avec cette technique de séparer de l'échantillon, la fraction protéique du sérum. Les petites protéines plasmatiques ont en effet une activité antioxydante. L'ORAC permet donc aussi de mesurer l'activité antioxydante des molécules non protéiques. C'est finalement une technique performante.

Une autre technique est utilisée. Il s'agit de la TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity). C'est aussi une méthode de dosage par différence, comme l'ORAC. Elle se fonde

sur l'inhibition de l'absorbance du 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), sous forme cationique (ABTS⁺) dues aux antioxydants, selon :



Les antioxydants présents dans l'échantillon diminuent la production de ABTS⁺ proportionnellement à leur concentration. Cette méthode est moins spécifique que la précédente. En effet, lors du dosage, ABTS réagit avec H₂O₂ pour générer des radicaux. Il est possible que les antioxydants réagissent directement avec les réactifs : diminuant ou augmentant la production de ROS. La mesure obtenue par la TEAC ne reflète donc pas tout à fait la neutralisation des radicaux libres par les antioxydants. De plus, il faut faire attention car la dilution du sérum a une influence sur la valeur du TEAC. De même, parmi les antioxydants qui participent à la réaction d'inhibition, soit la vitamine E, C, la SOD, la glutathion peroxydase, la transferrine et la ferritine, tous ne sont pas pris en compte de la même façon dans la valeur du TAS. En particulier, l'ascorbate et la vitamine E ne compteraient que pour 1.75 – 3.08% de la mesure alors que l'albumine, par exemple, compterait pour 28%. Pour qu'une modification des concentrations en vitamine E ou C ait un impact sur la valeur du TAS, il faut qu'elle soit assez forte. La TEAC a donc peu d'intérêt pour traduire les variations de concentration de ces antioxydants particuliers. Enfin, par rapport à l'ORAC, cette méthode est moins performante car il faut fixer le temps de la réaction pour obtenir les résultats.

La FRAP (Ferric Reducing Ability Assay) est une autre technique utilisée. Elle diffère des deux autres car aucun système générateur de ROS n'est appliqué au système. La FRAP mesure la réduction du fer, c'est à dire le passage de la forme ferrique en fer ferreux, en présence d'antioxydant. Elle présente l'avantage par rapport aux deux techniques précédentes de ne pas tenir compte de l'activité antioxydante des protéines sériques comme l'albumine. Simple et peu coûteuse, elle est cependant beaucoup plus limitée que les deux autres. D'abord, tous les mécanismes de défense antioxydants contre les ROS ne passent pas forcément par leur capacité à réduire Fe³⁺ en Fe²⁺, en particulier, l'activité du glutathion n'est pas prise en compte dans cette mesure. Ensuite, l'acide ascorbique peut réagir avec Fe²⁺ et être à l'origine de radicaux libres, ce qui fausse les résultats. Il est tout de même possible d'utiliser cette technique pour évaluer la capacité antioxydante plasmatique du chat, d'après **CHARLTON *et al.* (2000, a)**.

Malheureusement, selon les méthodes utilisées, les résultats expérimentaux ne sont pas les mêmes. La mesure de la capacité antioxydante du plasma dépend de la technique et du système générateur de ROS utilisés. Connaître les limites et les atouts de ces techniques permet de choisir la plus adaptée à ce que l'on cherche à mettre en évidence afin de mieux exploiter les résultats. L'ORAC semble être la technique de choix.

L'avantage des mesures du statut antioxydant total est qu'elles évaluent l'activité conjointe des différents antioxydants. Comme, *in vivo*, ils agissent le plus souvent en synergie, ces méthodes semblent être représentatives de ce qui se passe dans l'organisme. Pourtant, elles ne sont pas dénuées d'inconvénients. Le rôle de chaque antioxydant et sa participation relative à la défense de l'organisme n'est pas mesuré individuellement d'où, la difficulté à savoir quelle molécule est la plus efficace et donc la plus intéressante en supplémentation.

2.2.5. Mesure de l'oxydation des lipoprotéines de faibles densité (LDL)

La résistance des LDL à l'oxydation est mesurée *ex-vivo*. Un oxydant est ajouté dans l'échantillon. Lorsque les capacités antioxydantes des LDL sont dépassées, des diènes conjugués sont formés. Ils servent de marqueur du stress oxydatif. Le délai entre l'ajout de l'oxydant et la formation des diènes permet d'estimer la résistance des LDL. C'est une technique largement utilisée comme marqueur de la sensibilité des structures à l'oxydation en relation avec leur contenu antioxydant et lipidique. Un temps de référence a été établi chez le chat : 25.2 min, par **MAZUR et al. (2000)**.

Pour étudier les effets de la supplémentation en antioxydants des carnivores domestiques, il faut, d'abord, bien savoir au départ ce que l'on souhaite mettre en évidence (quantification des dégâts oxydatifs, existence d'un stress oxydatif ou aptitude de l'organisme à résister aux ROS...). Il s'agit, ensuite, de trouver le paramètre le plus représentatif et de tenir compte de tous les biais dans l'interprétation des résultats.

*En effet, selon la méthode choisie, le type d'analyseur utilisé, le protocole expérimental, les résultats diffèrent d'une étude à l'autre. Les chercheurs se servent de techniques variées. Cela rend la comparaison des résultats difficile. Il manque une méthode de référence standardisée. La plupart de ces mesures se déroulent *ex-vivo*. Se pose aussi le problème de savoir si ces études sont représentatives de ce qui se passe dans l'organisme. Les différents paramètres mesurés ont-ils un réel impact fonctionnel au niveau de l'animal ?*

3. Facteurs à prendre en compte dans l'étude de la supplémentation

Il semble qu'en fonction des animaux, leur race, leur âge et leur sexe, les effets de la supplémentation soient différents. Les capacités antioxydantes d'un organisme ne sont pas les mêmes d'un animal à l'autre et évoluent au cours de sa vie. Cela pose le problème de savoir quand commencer un programme de supplémentation et comment l'adapter à un organisme donné.

3.1. Effet de la race

Selon la race de chien, il semble que les valeurs moyennes de l'activité antioxydante ne soient pas les mêmes. L'étude de **HARPER et al. (1999, a)** a montré une différence significative entre les valeurs de l'activité plasmatique de la SOD et du statut antioxydant plasmatique total en fonction des races canines. En particulier, les Beagles ont eu des valeurs plus faibles que les Labradors et les Yorkshire terriers. Par contre, d'après **CHARLTON et al. (2000, e)**, si un autre marqueur comme l'activité de la catalase érythrocytaire, est utilisé, aucun effet de la race n'a été mis en évidence. Ces expériences ont posé le problème de savoir si les différences obtenues en fonction des races pour ces marqueurs traduisaient une réelle différence de leur activité antioxydante et, par la suite, de besoins différents selon les races.

Selon **KEARNS *et al.* (2000)**, avec l'ajout de dose croissante de β -carotène (17.9mg/kg puis 43.7mg/kg) dans l'alimentation, le pourcentage de CD3+, CD4+ et CD8+ a été plus important chez les fox terriers que chez les labradors (bien que ces résultats ne soient pas statistiquement significatifs). Plus intéressant encore, les labradors ont eu un pourcentage de cellules B significativement plus élevé que celui des fox-terriers. Cela montrerait une meilleure RIMH et une résistance accrue aux infections dans cette race. Certaines races répondraient donc mieux à la supplémentation que d'autres.

Les besoins alimentaires en antioxydants ont l'air différents en fonction des races. Nous avons vu précédemment que les races géantes développent, en général, une mauvaise réponse immunitaire après une primo-vaccination. Plus que pour les autres chiens, leur supplémentation serait bénéfique.

Trop peu de données sont disponibles pour conclure sur l'existence ou non d'un effet de la race sur le statut antioxydant d'un animal et sur les conséquences sur son éventuelle supplémentation. Ces quelques expériences permettent juste d'attirer l'attention sur ce point. De nouvelles recherches semblent nécessaires pour prouver ou non l'existence d'un tel effet, afin de savoir s'il est possible de généraliser les expériences réalisées dans une race à l'ensemble de l'espèce et pour établir des programmes de supplémentation adaptés.

3.2. Effet de l'âge

3.2.1. Variations du statut antioxydant en fonction de l'âge

Chez le chat, la méthode du TEAC est utilisée pour évaluer le statut antioxydant plasmatique total. D'après **FRITH *et al.* (1998)**, le TAS des chats de race short-haired a augmenté jusqu'à ce qu'ils atteignent l'âge de 2 mois puis a décliné lentement. Le statut antioxydant est donc modifié en fonction de l'âge des animaux.

HARPER *et al.* (1999, b) ont mesuré par spectrophotométrie le TPAO (Total Plasma Antioxydant Capacity) de 134 chats et ont mis en évidence une diminution significative de ce paramètre avec l'âge.

Pourtant, les niveaux d'activité des enzymes antioxydantes félines ne sont pas influencés par l'âge selon l'étude de **CHARLTON *et al.* (2000, c)**.

Chez le chien, le TAS des femelles diminue légèrement avant 1 an, d'après **FRITH *et al.* (1998)**. Mais, à part cela, aucun changement avec l'âge n'est ensuite noté.

Il est donc impossible de conclure quant à un effet de l'âge sur l'activité antioxydante de ces deux espèces. Selon le marqueur, les résultats sont différents. Le problème reste de savoir si les effets de l'âge doivent être pris en compte dans les programmes de supplémentation ou s'ils sont trop discrets pour avoir une traduction au niveau de l'organisme.

3.2.2. Les besoins des jeunes animaux

Il est intéressant d'étudier le statut antioxydant des jeunes autour de la période du sevrage. C'est une étape critique de leur vie car ils sont très fragiles et sensibles aux modifications de leur environnement extérieur. Certains chercheurs ont donc pensé qu'il pourrait être particulièrement intéressant de compléter ces animaux pour, par exemple, renforcer leurs défenses immunitaires, optimiser leur croissance ou leur assurer, dans l'avenir,

un meilleur statut antioxydant. Nous avons déjà discuté de l'éventuelle utilité de la supplémentation en antioxydant sur le système immunitaire des chiots de races géantes.

HARPER *et al.* (2000) ont étudié l'évolution du TPAO par une méthode colorimétrique, pendant la période du sevrage, chez le chaton. Les échantillons de plasma sont récoltés sur des chatons à 14, 35 et 60 jours. A 14 jours, les chatons complètement dépendant du lait maternel pour leur apport nutritionnel, ont eu un statut antioxydant dans les limites inférieures des valeurs usuelles du chat adulte. A 35 jours, les chatons commencent à avoir une alimentation solide, mais les résultats expérimentaux ont montré que leur statut antioxydant n'était pas optimal. A 60 jours, le même statut que celui de l'adulte était atteint. Le lait maternel semble donc suffisant pour que les chatons puissent acquérir un statut antioxydant maximal à 60 jours. Cependant, enrichir leur alimentation autour de 35 jours, lorsqu'ils sont moins dépendant du lait maternel, pourrait permettre d'aider à renforcer leur organisme.

3.2.3. Les effets de la supplémentation sont différents entre l'animal âgé et le plus jeune

Les performances cognitives de deux groupes de beagles ont été étudiées par **MILGRAM *et al.* (2001)** : le premier groupe avait un âge compris entre 10 et 13 ans, le second entre 3 et 5 ans. Ces animaux ont été supplémentés pendant un mois avec divers antioxydants. Les performances cognitives des vieux chiens ont été accrues après supplémentation. L'enrichissement n'a eu, par contre, aucun effet sur celles des chiens adultes. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que, ces animaux ne souffrant d'aucune maladies neurodégénératives, les antioxydants ne semblent pas utiles. Par contre, l'utilité d'un programme de supplémentation en prévention n'est pas connue.

Supplémenter les animaux âgés en antioxydants pour lutter contre le déclin de leurs fonctions immunitaires, est de plus en plus réalisée. D'après **HAYEK *et al.* (2000)**, quel que soit l'âge, enrichir l'alimentation du chat avec des doses de 250 et 500 UI de vitamine E/ kg d'aliment a des effets immunologiques bénéfiques. De la même façon, d'après **MEYDANI *et al.* (1998)**, supplémenter des chiens avec 280 UI de vitamine E/kg pendant 8 semaines a permis d'augmenter leur concentration plasmatique en vitamine E et d'améliorer les performances de leur système immunitaire. Il est intéressant de noter que les jeunes chiens (âgés de 0.9 à 4.4 ans) ont mieux répondu à la supplémentation que les vieux chiens (âgés de 7.5 à 11.1 ans) : leur concentration plasmatique en vitamine E a été accrue respectivement de 50% contre 25% chez les plus âgés. Cette différence montrerait des besoins différents entre les différentes classes d'âge.

Ces deux expériences montrent que les besoins en antioxydants s'accroissent avec l'âge. En effet, les dégâts cellulaires s'accumulent avec le temps et les défenses antioxydantes deviennent de moins en moins performantes. Même si aucun résultat expérimental ne le prouve directement, le déclin du statut antioxydant de l'organisme avec l'âge est soupçonné. Les animaux vieillissants sont donc plus susceptibles de développer des maladies oxydatives. Il semble donc logique de supplémenter de préférence ces animaux.

Il est clair qu'en fonction de l'âge, les besoins des animaux sont différents. Pour cela, il serait intéressant d'enrichir l'alimentation des animaux âgés et des jeunes autour de la période du sevrage. Cependant, certaines grandes questions se posent encore. Quand commencer la supplémentation ? Doit-on mener un programme de supplémentation toute la vie de l'animal ou seulement pour faire face aux périodes à risques (le début de la vie, la fin de vie, une anesthésie, une épreuve sportive...)? L'enrichissement est-il profitable en

prévention à long et/ou à court terme ? Malgré le manque de preuves, la tendance actuelle semble aller dans le sens d'une supplémentation comme moyen de prévention.

3.3. Effet du sexe

Les chercheurs se sont demandés s'il fallait prendre en compte le sexe de l'animal dans l'étude des effets de la supplémentation en antioxydant.

D'après **GREELEY et al. (1996)**, la proportion des cellules T du système immunitaire est augmentée avec l'âge. Cette augmentation a été plus faible chez les mâles que chez les femelles. Une quantité moins importante de ces cellules et une diminution de leur efficacité sont liées à une incidence supérieure des phénomènes d'auto-immunité et cancéreux. Or, les femelles sont plus sensibles aux maladies auto-immunes. Est-ce un argument suffisant pour justifier une plus forte supplémentation des femelles à titre préventif ?

Aucune preuve expérimentale ne met directement en évidence que les statuts antioxydants varient en fonction du sexe. Certaines études montrent qu'il existe des différences, d'autres non. Ainsi, la concentration plasmatique de SOD a été significativement plus élevée chez les mâles que chez les femelles, d'après **HARPER et al. (1999, a)**, chez le chien. Par contre, la concentration érythrocytaire en catalase n'est pas influencée par le sexe, ni chez le chat ni le chien selon **CHARLTON et al. (2000, d)** et **CHARLTON et al. (2000, e)**. Cela a aussi été le cas du statut antioxydant total chez le chat, mesuré par méthode colorimétrique par **FRITH et al. (1998)**. Cet effet du sexe n'est pas encore très clair.

Un des facteurs limitant pour décrire la relation entre l'utilisation d'antioxydants et une maladie, est le manque de méthodes de mesures spécifiques d'un antioxydant dans les systèmes biologiques. L'absence de marqueur sensible, de méthode de référence empêchent de conclure définitivement sur l'efficacité d'une supplémentation. Les conclusions expérimentales varient en fonction des protocoles et de l'échantillonnage. Il n'est, de ce fait, pas possible de généraliser ces résultats à l'ensemble de la population canine ou féline.

Plusieurs études semblent démontrer l'efficacité des programmes d'enrichissement. Cependant, il est important de bien définir le cadre de leur utilisation car c'est un domaine de recherche en plein essor. Il ne s'agit pas de compléter en antioxydant à tout va. La réalisation des programmes de supplémentation doit être un acte réfléchi.

PARTIE IV : ETABLIR UN PROGRAMME DE SUPPLEMENTATION

1. Devenir des antioxydants dans l'organisme

1.1. Les carnivores domestiques peuvent-ils absorber les antioxydants ?

L'étude pharmacocinétique des antioxydants est importante à mettre en oeuvre. Elle permet de mettre en évidence l'augmentation de leurs concentrations plasmatiques après leur supplémentation orale. Ces données prouvent que les chiens et les chats peuvent absorber efficacement ces molécules et qu'il est possible d'agir ainsi sur leur statut antioxydant. Un seul cas pose pourtant problème : le β -carotène, comme nous le verrons par la suite, il semble que certains animaux ne l'absorbent pas.

Ensuite, il est nécessaire d'établir ce type de courbes spécifiquement chez le chien et le chat. Une erreur à ne pas commettre est de généraliser les résultats des expériences de supplémentation obtenus chez l'homme ou chez les rongeurs, aux carnivores domestiques, car le métabolisme des antioxydants est différent dans chacune de ces espèces. Au sein même des carnivores domestiques, il existe des différences dans l'absorption des antioxydants. Nous illustrerons ceci à travers l'exemple du β -carotène. La vitamine C pose aussi problème dans l'établissement des programmes de supplémentation. Une particularité du chien et du chat est leur capacité à la synthétiser. De ce fait, ils assurent leur couverture indépendamment de leur alimentation.

1.1.1. Les caroténoïdes

1.1.1.1. Les caractéristiques d'absorption du β -carotène sont différentes en fonction de l'espèce

CHEW *et al.* (2000, b et c) ont mis en évidence le fait que les carnivores domestiques sont sensibles à la supplémentation orale en β -carotène. Leurs courbes d'absorption après une dose orale unique sont représentées sur les figures 30 et 31.

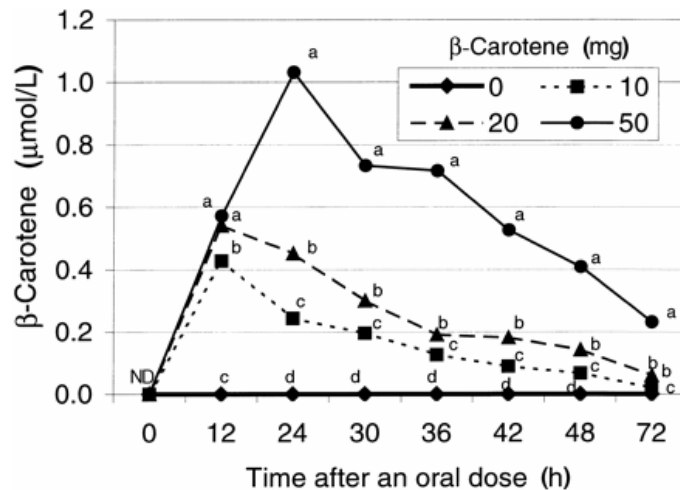


Figure 29. Courbe d'absorption du β -carotène après administration orale unique par le chat (d'après CHEW, 2000, b).

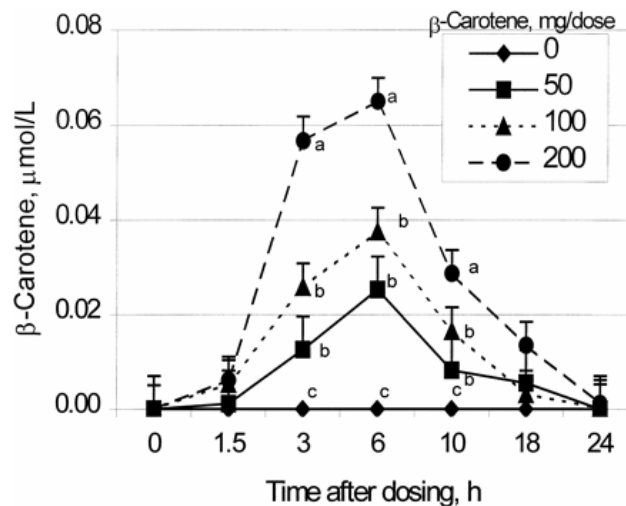


Figure 30. Courbe d'absorption du β -carotène après administration orale, chez le chien (d'après CHEW, 2000, c).

Après un temps de latence, les concentrations plasmatiques en β -carotène sont augmentées de façon dose dépendante. Le pic est atteint en 12-24 h chez le chat et plus précocement chez le chien, en 6 h. Le temps de demi-vie plasmatique est de 3-4 h chez le chien et de 12-30 h chez le chat. Cependant, dès l'arrêt de la supplémentation, ces concentrations retrouvent rapidement leur niveau initial. Ces deux espèces animales peuvent absorber efficacement le β -carotène à travers leur muqueuse intestinale. Les caractéristiques pharmacocinétiques sont, cependant, différentes entre le chien et le chat. S'il faut établir un programme de supplémentation en β -carotène, il faudra tenir compte de ces données cinétiques.

Un autre des problèmes que pose la supplémentation en β -carotène est son activité pro-vitaminique A. La vitamine A n'a pas de propriétés antioxydantes et une partie du β -carotène alimentaire pourrait être convertie en vitamine A et serait ainsi perdue dans la lutte contre les radicaux libres. Chez le chien, il semble que cela ne soit pas le cas. CHEW *et al.* (2000, c) ont montré que la supplémentation en β -carotène n'entraînait pas un accroissement de la

concentration plasmatique en rétinol. Après son absorption, le β -carotène est donc directement disponible pour l'organisme.

Le chat, contrairement au chien, n'utilise pas le β -carotène pour synthétiser la vitamine A. Il n'a pas l'enzyme intestinale assurant la conversion. Dans cette espèce, la supplémentation en β -carotène n'a pas d'influence sur la concentration plasmatique en rétinol. Il existerait un mécanisme de transport intestinal spécifique pour permettre l'absorption du β -carotène.

1.1.1.2. Cas particuliers des individus ne répondant pas à la supplémentation en β -carotène

D'après **CHEW *et al.* (2000, d)**, il existe une grande variabilité individuelle concernant l'absorption du β -carotène. La concentration circulante de β -carotène de quelques animaux n'a été que très faiblement influencée par l'alimentation. Ces animaux ne peuvent absorber que de faibles quantités, ils sont appelés les « low responders » (LR) (tableau 11).

Tableau 11. Comparaisons de l'absorption et de la réponse immunitaire du β -carotène chez les « low-responders » (LR) et « responders » (R) chez des chiens nourris avec 20 et 50 mg de β -carotène par jour, pendant 8 semaines (d'après CHEW, 2000, c).

| | Temps, semaines | | | | | |
|--|-----------------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | |
| <hr/> | | | | | | |
| Concentration plasmatique en β -carotène, $\mu\text{mol/L}$ | | | | | | |
| LR | 0 | 0.012 | 0.004 ^b | 0.005 ^b | 0.013 ^b | |
| R | 0 | 0.050 | 0.067 ^a | 0.083 ^a | 0.074 ^a | 0.019 |
| Indice de stimulation de la population cellulaire B après injection de Con A (20 mg/L) | | | | | | |
| LR | 58 | 67 | 31 ^b | 47 ^b | 113 | |
| R | 79 | 75 | 81 ^a | 118 ^a | 103 | 20 |
| Indice de stimulation de la population cellulaire B après injection de PWM (10 mg/L) | | | | | | |
| LR | 30 | 45 | 27 | 27 ^b | 78 | |
| R | 63 | 57 | 56 | 89 ^a | 89 | 18 |

($n = 4$ pour LR; $n = 24$ pour R)

IgG, immunoglobuline G; Con A, concanavaline A; PWM, pokeweed mitogen.

Dans cette expérience, 4 chiens sur 28 (14% de l'effectif) n'ont pas répondu à l'ajout de β -carotène dans leur alimentation. Leurs concentrations plasmatiques sont restées faibles malgré les 8 semaines de supplémentation. Il est aussi intéressant de constater qu'après injection de ConA et PWM, les indices de stimulation des LR sont plus faibles que chez les R. Un tel résultat peut-il être mis en parallèle avec leur faible capacité d'absorption du β -carotène ?

Cette faible sensibilité à la supplémentation orale existe aussi dans d'autres espèces dont l'homme et le chat (KIM *et al.* (2000, a)). Selon CHEW *et al.* (2000, c) la concentration plasmatique de deux chats sur six, supplémentés à 5 mg de β -carotène pendant 6 jours consécutifs n'a pas augmenté à la suite de la supplémentation. Par contre une dose de 20 mg a réussi à la modifier. Le problème reste donc de savoir si les « L R » ne sont sensibles qu'à de fortes doses de β -carotène.

1.1.2. Le problème de la vitamine C

Le chien et le chat synthétisent la vitamine C à partir du glucose au niveau du foie. Il est couramment admis que cette synthèse suffit à les protéger des carences. Ils peuvent aussi l'absorber par diffusion passive tout le long de l'intestin (en particulier au niveau de l'iléon) de manière efficace (aux doses physiologiques, l'efficacité de l'absorption est de 80-90%). Transporté grâce à l'albumine, l'acide ascorbique est ensuite largement distribué dans l'organisme. Son élimination est majoritairement urinaire et l'augmentation de l'excrétion rénale permet de limiter l'accroissement de la concentration plasmatique en acide ascorbique. Or, les études montrent qu'il n'est pas possible d'obtenir des changements de la concentration plasmatique en vitamine C avec une supplémentation orale des chiens sur le long terme. D'après MARSHALL *et al.* (2002), la réponse plasmatique à la supplémentation avec 1 g d'acide ascorbique a été transitoire et a disparu après 24 heures. Selon PIERCY *et al.* (2000), la faible biodisponibilité, la rapidité du métabolisme et de l'excrétion ou la production endogène a peut-être été à l'origine de cet échec de la supplémentation.

Ces données de pharmacocinétique sont indispensables à connaître pour établir les programmes de supplémentation : dose, rythme d'administration... Ces études permettraient d'obtenir l'adéquation entre les besoins des animaux et les apports alimentaires. De plus, elles ont mis en évidence certains problèmes : d'une part, il semble que supplémenter avec de grandes quantités de β -carotène n'ait aucun effet chez certains animaux, d'autre part, les chercheurs ne parviennent pas à accroître durablement la concentration plasmatique en vitamine C par l'alimentation. Si au départ, certains antioxydants ne sont pas absorbés efficacement par l'organisme, quel est alors l'intérêt de leur supplémentation ? De plus, après avoir été absorbés, les nutriments sont distribués dans tout l'organisme. Une autre condition pour espérer obtenir une supplémentation efficace est que les antioxydants puissent se concentrer là où l'organisme en a besoin.

1.2. Les carnivores domestiques peuvent-ils concentrer efficacement les antioxydants dans les tissus et les cellules ?

Grâce à la supplémentation orale en antioxydants, il est possible d'augmenter leurs concentrations circulantes. Cependant, pour parvenir à renforcer les défenses de l'organisme, il faut qu'elles soient augmentées dans les tissus et les cellules où existe du stress oxydatif. Les deux études suivantes semblent mettre en évidence un lien entre une meilleure protection de l'organisme et une concentration accrue en antioxydant dans certains tissus, pour le premier exemple, ou dans des cellules, dans le deuxième exemple.

La consommation de lycopène est associée à un risque plus faible de développement du cancer de la prostate. Les résultats expérimentaux obtenus par KORYTKO *et al.* (2003) ont confirmé que chez le chien, le lycopène administré oralement se concentrait dans divers tissus

et spécifiquement dans cet organe. C'est un argument de plus en faveur de l'intérêt de la supplémentation en lycopène pour prévenir le risque d'apparition d'un cancer dans la prostate et dans d'autres tissus.

Nous avons vu le rôle important des caroténoïdes dans l'immunité. Le chien et le chat absorbent le β -carotène à travers leur muqueuse intestinale. Pour justifier l'intérêt d'une telle supplémentation pour renforcer l'immunité, **CHEW *et al.* (2000, c et d)** ont étudié la prise en charge de cette molécule par les leucocytes sanguins périphériques et leurs organites cellulaires. Chez le chien, le β -carotène a été transféré dans les lymphocytes et les neutrophiles. Il s'est concentré dans le cytosol, les mitochondries et les microsomes de ces deux types cellulaires et dans le noyau des lymphocytes. Chez le chat, ce sont les lymphocytes qui prennent en charge la majeure partie du β -carotène. Par l'alimentation, il est donc possible d'augmenter les concentrations en β -carotène dans les cellules immunitaires. Cette étude renforce l'idée de l'importance physiologique du β -carotène et de son rôle dans les défenses de l'organisme.

De plus, la vitamine E se concentre en partie dans les cellules musculaires. Elle serait donc particulièrement utile pour prévenir les dommages oxydatifs induits par un effort physique. Par contre, d'après **PILLAI *et al.* (1993)**, sa concentration dans le cerveau est moins influencée par la supplémentation avec 114 \pm 14 mg/kg d'acétate d' α -tocophéryl que les autres tissus. Il faudra tenir compte de cette donnée dans la prévention des maladies neurodégénératives.

La vitamine C est présente en quantité non négligeable dans les granulocytes, d'où son intérêt potentiel pour renforcer les défenses immunitaires de l'organisme.

De la même façon, la supplémentation en taurine est intéressante pour prévenir les dégâts oxydatifs au niveau du cœur, de la rétine, du système nerveux central et des muscles squelettiques, tissus où sa concentration est la plus importante. Elle est également présente dans les globules blancs d'où son intérêt dans l'immunité.

Ces études de la distribution tissulaire et cellulaire des antioxydants administrés oralement sont essentielles pour comprendre leur rôle dans l'organisme. Ce sont dans les tissus ou les cellules, où les antioxydants pourront se concentrer qu'ils auront une action efficace.

Les carnivores domestiques sont sensibles à la supplémentation alimentaire en antioxydants. Après leur administration orale, ceux-ci sont absorbés au cours du transit intestinal. Ils circulent ensuite dans l'organisme avant de se concentrer dans certains tissus, différents selon les antioxydants. Plus la dose orale est forte, plus la concentration plasmatique est importante mais, quelle est la dose idéale, pour obtenir les meilleurs effets ?

2. Dose utilisable en supplémentation

Les concentrations plasmatiques du chien et du chat sains non supplémentés sont connues. Ces valeurs sont définies pour éviter un état de carence : au-dessous de ces seuils, l'animal souffre des signes cliniques liés au déficit en nutriment. Elles permettent de connaître la dose de vitamines nécessaire à l'animal pour couvrir ses besoins : c'est la quantité nécessaire et suffisante pour que l'animal ne présente aucun trouble (Tableau 12).

Tableau 12. Apports recommandés chez les carnivores domestiques en quelques vitamines et oligo-éléments (d'après BSAVA, 1996).

| Besoins | Vitamine E | β -carotène | Vitamine C | Mg | Mn | Zn | Se | Taurine |
|---------|---|-------------------|------------|------|-----|----|------|--|
| CHIEN | 3 2,44* (NRC) 5,71** (AAFCO) | - | - | 38.4 | 0.5 | 5 | 0.01 | - |
| CHAT | 1.4 3,66*** (NRC) 3**** (AAFCO) | - | - | 30 | 1 | 4 | 0.01 | 250mg/kg (boîte) 100mg/kg (sec) |

Les valeurs sont exprimées en mg/400 kcalEM.

Il n'existe pas de recommandations internationales concernant les apports en caroténoïdes indépendamment de leur fonction provitamine A.

La pharmacocinétique de la taurine est mal connue chez le chien, une approche similaire à celle du chat est adoptée.

NRC: National Research Council, AAFCO: Association of American Feed Control Officials, EM: Energie métabolisable.

* 20 UI/kg aliment à 3300 kcal

** 50 UI/kg aliment à 3500 kcal

*** 30 mg/kg aliment

**** 30 UI/kg aliment à 4000 kcal

Pour établir les doses d'antioxydants utiles en supplémentation, un problème tout à fait différent se pose : il s'agit de fournir à l'organisme une quantité de molécules nettement supérieure à celle dont il a besoin. Les besoins minimaux doivent être couverts afin de prévenir tout état de carence et l'excédent sert à assurer un statut antioxydant efficace. Pour espérer obtenir des effets, il semble intéressant de chercher à saturer le plasma en antioxydants. Dans la plupart de leurs travaux, les chercheurs n'ont pas atteint la concentration saturante plasmatique en antioxydant. Selon la durée de la période de supplémentation, la dose utilisée, les protocoles expérimentaux...les concentrations finales atteintes varient.

2.1. Dose et durée de la supplémentation

Pour obtenir des concentrations plasmatiques élevées et des effets prolongés, il est possible de jouer sur deux facteurs : l'augmentation de la dose et/ou de la durée de la supplémentation. Les figures 32 et 33 présentent les résultats obtenus chez le chien (CHEW *et al.*, 2000, c).

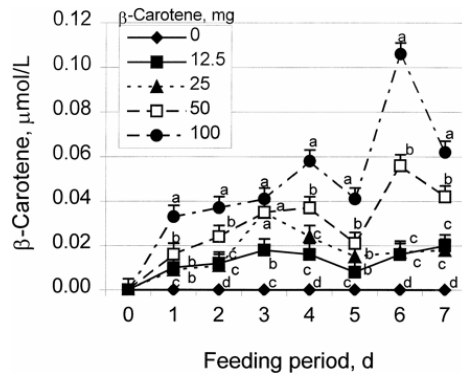


Figure 31. Concentration plasmatique en β -carotène chez des chiens supplémentés quotidiennement avec 0, 12.5, 25, 50 ou 100 mg de β -carotène pendant 7 jours (d'après CHEW, 2000, c).

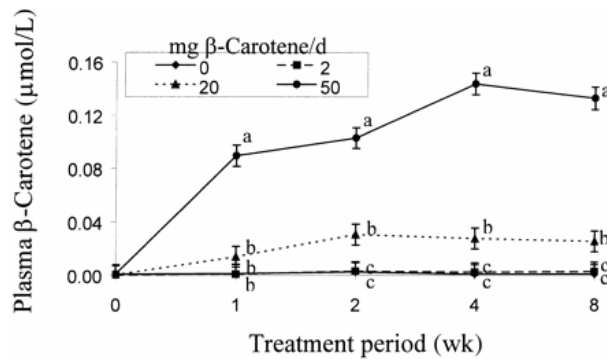


Figure 32. Concentrations plasmatiques en β -carotène de chiens supplémentés avec 0, 2, 20 ou 50 mg de β -carotène pendant 8 semaines (d'après CHEW, 2000, c).

Au bout de 6 jours, avec une dose de 100 mg de β -carotène, la concentration plasmatique obtenue est de 0.1 μ moles/L. La même concentration peut être atteinte avec une dose plus faible de 50 mg sur une durée de 8 semaines. Grâce à la supplémentation, les concentrations plasmatiques triplent voire quadruplent, comparées aux valeurs usuelles, mais l'utilisation de doses plus faibles sur une période de supplémentation plus longue permettrait d'éviter l'emploi de trop fortes doses qui font craindre l'apparition d'effets toxiques. De plus, en jouant sur la durée de l'enrichissement, les concentrations plasmatiques obtenues semblent plus stables, au court du temps.

Enfin, que l'expérimentateur choisisse d'augmenter la dose d'antioxydant dans la ration ou de supplémenter sur de longues périodes, il est presque toujours possible d'augmenter fortement la concentration plasmatique en antioxydant. Mais cette augmentation n'est pas forcément le reflet de l'efficacité de la supplémentation. En effet, est-ce en atteignant la saturation plasmatique que des effets optimaux sont obtenus au niveau de l'organisme ?

2.2. Variabilités des effets en fonction de la dose

FICO *et al.* (1986) ont expérimenté les effets de différentes doses de sélénium sur la croissance de quatre lignées cellulaires issues de tumeurs canines différentes (Tableau 13).

Tableau 13. Influence de l'augmentation de la concentration en sélénium sur la diminution de la viabilité de cellules tumorales en cultures (d'après FICO *et al.*, 1986).

| Lignées cellulaires | 0.2 µg/ml de Se | 0.8µg/ml de Se |
|---------------------|-----------------|----------------|
| CMT13 | + | 97% |
| CMT14B | + | 51% |
| CMT14A | 0 | 40% |
| CMT11 | 0 | <20% |

+ : l'ajout de 0.2 µg/ml de Se diminue la viabilité des lignées cellulaires CMT13 et CMT14B.

L'inhibition de la croissance tumorale est dépendante de la dose de sélénium utilisée. Pour obtenir une efficacité optimale de la supplémentation sur le processus cancéreux, il convient donc d'utiliser la dose appropriée.

D'après HAYEK *et al.* (2000), les réponses immunologiques optimales à la supplémentation en vitamine E d'un groupe de chats âgés (moyenne d'âge : 9.92 ans) est différent en fonction des quantités employées. La production de PGE2 est diminuée à une dose de 500 UI de vitamine E par kilo de nourriture. Par contre, la plus forte réponse à la stimulation antigénique à la PHA est atteinte pour une dose de 250 UI. Ce n'est donc pas toujours en utilisant la plus forte dose possible que les meilleurs résultats sont obtenus. Avant de définir une dose idéale, de plus amples recherches sont nécessaires.

2.3. Forme galénique

Les antioxydants sont disponibles sous différentes formes (naturelles ou de synthèse par exemple), isomères... Les expérimentateurs peuvent alors choisir d'utiliser la vitamine pure ou des aliments connus pour leur richesse en vitamines.

Par exemple, MILGRAM *et al.* (2002, a) et MILGRAM *et al.* (2002, b) ont choisi d'ajouter au menu, lors des expériences sur le syndrome de dysfonctionnement cognitif canin, un mélange d'épinards, de sauce tomate, de tomate en grappe, de carotte et de citron. Leurs effets sur la santé sont reconnus. Chez l'homme, leur consommation est associée à des risques diminués de cancer par exemple. Peut-être que des substances non identifiées de ces aliments jouent un rôle dans la protection de l'organisme ? Plus que l'ajout d'antioxydants, l'équilibre de la ration et la qualité des aliments de départ serait important.

Lorsque les chercheurs choisissent d'utiliser la vitamine sous forme purifiée, ils doivent trouver la molécule qui sera la plus efficacement absorbée et la plus active. Nous allons illustrer ceci à travers l'exemple de la vitamine E.

Il en existe huit formes connues réparties en deux catégories : les tocophérols et les tocotriénols. Chacune d'elles est divisées en quatre sous-groupes : α , β , γ et δ . L'activité de ces différentes formes varie : les tocotriénols sont moins actifs que les tocophérols et l' α -tocophérol est la forme la plus active de toute. Dans l'organisme, ce dernier est présent sous la

forme de l'isomère D, mais il est disponible dans le commerce sous la forme d'un mélange racémique. Il serait intéressant de savoir quelle forme est utilisée lorsque l'on parle de vitamine E afin de n'employer que la forme active.

FICO *et al.* (1986) ont expérimenté les effets de l'addition de sélénium sur quatre lignées cellulaires isolées à partir de tumeurs mammaires canines différentes. Selon la forme du sélénium employée, la croissance tumorale a été plus ou moins inhibée. Les cellules cancéreuses se sont révélées plus sensibles au sélénodiglutathion. A partir de leurs résultats, les chercheurs ont classé les différentes formes par ordre d'efficacité décroissante : le sélénodiglutathion est plus actif que le sélénite de sodium, puis que la sélélocystine et enfin que la sélénométhionine. Les raisons de ces différences ne sont pas encore élucidées. Les niveaux de sélénium dans l'organisme étant largement dépendant de la quantité présente dans la ration, le type de sélénium du repas aurait probablement une influence sur son absorption. Selon la forme utilisée, les cellules concentreraient ou métaboliseraient le sélénium différemment.

Par la supplémentation, il est possible de saturer le plasma en antioxydants. L'obtention d'une concentration plasmatique maximale fait espérer des effets maximaux. Pour l'atteindre il est possible d'intervenir sur la durée du programme de supplémentation, la dose et la forme de l'antioxydant utilisé. Mais, la dose la plus forte ne permet pas toujours d'obtenir les meilleurs effets. Il faut donc trouver la dose qui permette d'avoir des effets intéressants, sans être toxique.

3. Toxicité des antioxydants

Les doses de vitamines utilisées en supplémentation sont assez fortes. Ces molécules ne présentent qu'une faible toxicité. La tendance actuelle est d'enrichir les aliments avec le maximum possible d'antioxydants. Pourtant, cette utilisation de fortes doses n'est pas dénuée de danger.

3.1. Vitamine C

3.1.1. Action sur l'acidose métabolique après un effort

Une acidose lactique est souvent constatée après un effort intense de courte durée. D'après **MARSHALL *et al.* (2002)**, la supplémentation en vitamine C, molécule acide, pourrait donc exacerber l'acidose métabolique constatée chez les chiens après une course et participer à l'altération de la contractilité musculaire, et donc de leurs performances. Cependant, il n'existe aucune preuve de l'influence de la vitamine C sur le trou anionique et le pH sanguin. Si la vitamine C participe à la diminution du pH sanguin, son effet est minime. Un tel mécanisme d'action pour expliquer la diminution des performances est donc peu probable.

3.1.2. Risque de calcul

L'élimination de la vitamine C est surtout urinaire. Les doses utilisées en supplémentation pourraient causer l'augmentation de l'excrétion urinaire d'acide oxalique et le risque potentiel de lithiases à oxalates de calcium. Pour étudier cet effet potentiel, **CHARLTON *et al.* (18)** ont enrichi l'alimentation de 5 chats avec 58 mg de vitamine C/400kcal par jour pendant 25 jours. Le pH urinaire a été mesuré avant et après toute supplémentation : il est passé d'une valeur moyenne de 6.17 +/- 0.16 unités de pH à 6.38 +/- 0.35. Ce résultat montre que l'enrichissement ne semble avoir aucune influence sur le pH urinaire.

3.2. Vitamine E

3.2.1. Effet antivitamine K

La supplémentation à fortes doses de vitamine E n'est pas associée à des effets délétères significatifs. Cependant, il faut noter que la vitamine K est potentiellement inhibée par la vitamine E : sous forme de quinone, la vitamine E diminue l'adhésion plaquettaire. **O'REILLY *et al.* (2000, a)** ont exploré les effets de fortes doses de vitamine E sur l'hémostase. Le temps de saignement de chats supplémentés avec 1000 UI de vitamine E/kg d'aliment n'a pas été significativement augmenté. Ce résultat confirme des études menées chez l'homme, mais sont différents de ceux obtenus chez le rat. De plus amples recherches semblent ainsi nécessaires avant de conclure sur l'innocuité de l'utilisation de fortes doses de vitamine E et ses effets sur l'hémostase.

3.3. Effet pro-oxydants à fortes doses

Des effets pro-oxydants peuvent être mis en évidence *in vitro* pour tous les agents réducteurs. Qu'en est-il réellement *in vivo* ?

3.3.1. Vitamine E

3.3.1.1. Expérience de supplémentation

Un programme d'enrichissement à des doses de 100 UI d'acétate d' α -tocophérol par jour, pendant 8 semaines puis de 1000 UI pendant 8 semaines encore, a été expérimenté par **HILL *et al.* (2001, a)**, chez des lévriers de courses. Leurs temps de course ont été mesurés et montrent que les chiens supplémentés à 1000 UI sont moins rapides. L'utilisation de la vitamine E serait donc néfaste aux performances de ces chiens. Par contre, les temps de course des chiens supplémentés à une dose de 100 UI et du groupe témoin sont comparables. Seules les fortes doses de vitamine auraient des effets négatifs, d'un point de vue sportif.

3.3.1.2. Effets pro-oxydants

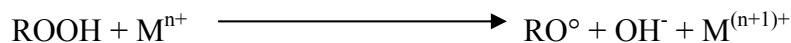
Les radicaux peroxy- réagissent plus rapidement avec le tocophérol qu'avec les lipides. Une molécule de tocophérol suffit pour protéger 10^3 - 10^8 molécules d'AGPI, si le niveau de peroxyde est faible. Cela pourrait expliquer le fait que la concentration en α -

tocophérol (AT) dans les membranes cellulaires ramenée à celle en AGPI ne soit pas très élevée : AT/Ac Arachidonique = 1/500 dans la membrane érythrocytaire. Une faible quantité de vitamine E suffit à interrompre les réactions de propagation. A de fortes concentrations, des effets pro-oxydants sont à craindre.

Il existe des réactions parallèles qualifiées de pro-oxydatives faisant intervenir la vitamine E. L'effet pro-oxydant de l' α -tocophérol serait, en particulier, lié au radical tocophéroxyl (A-TO $^{\circ}$). Il pourrait oxyder directement les lipides membranaires en l'absence de molécules capables de régénérer le tocophérol comme la vitamine C.

3.3.1.3. *Effets co-pro-oxydants*

In vitro, les tocophérols sont capables de réduire les ions métalliques (M $^{n+}$) selon des réactions similaires à celle de Fenton :



Ces ions (M $^{(n+1)+}$) sont ensuite capables d'exercer leur action pro-oxydantes. Les tocophérols ne sont pas directement des pro-oxydants, dans ce cas. Ils réagissent plutôt de façon synergique, en présence de pro-oxydants reconnus comme les métaux de transition sous forme ioniques, les lipides peroxydés... C'est pour cela qu'ils sont appelés co-pro-oxydants.

3.3.2. **Vitamine C**

3.3.2.1. *Expérience de supplémentation*

A haute dose, la vitamine C est potentiellement dangereuse : ses effets pro-oxydants seraient prépondérants sur ses propriétés antioxydantes.

Une étude de supplémentation en vitamine C à une dose de 500 mg par jour a été menée chez 30 personnes, pendant 6 semaines par **PODMORE *et al.* (1998)**. Le niveau de 8oxoadénine, utilisé comme marqueur des lésions oxydatives sur l'ADN, a été significativement augmenté avec l'enrichissement. A des doses plus faibles, soit moins de 500mg, ce sont les effets antioxydants qui ont prédominé. Néanmoins, il ne faut pas négliger cette potentielle activité pro-oxydante et surtout en tenir compte dans la réalisation d'un programme de supplémentation.

De tels effets sont aussi suggérés chez des chats dont l'alimentation est enrichie avec 250 mg d'ascorbate. D'après **HILL *et al.* (2001, b)**, les chats supplémentés ont eu une concentration en glutathion plus faible par rapport aux chats du groupe témoin soumis à un stress oxydatif, ce qui laisse supposer l'existence d'un effet pro-oxydant de la vitamine C à une telle concentration.

Des chiens supplémentés avec 1 g d'ascorbate ont eu des temps de course plus long que les non supplémentés : 0.2 secondes de plus sur une course de 500 m. D'après **MARSHALL *et al.* (2002)**, ce résultat semble confirmer les effets délétères de l'utilisation des hautes doses de vitamine C. Mais, il faut nuancer cette conclusion : tout d'abord, à des doses plus modérées, des effets positifs existent, ensuite, les marqueurs du stress oxydatif utilisés, le TEAC et le TBARS, ne sont pas affectés par la supplémentation en vitamine C. Celle-ci pourrait donc exercer ces effets négatifs non pas comme pro-oxydant mais en agissant directement sur le travail musculaire, comme nous l'avons vu précédemment.

De plus, les résultats de cette expérience sont biaisés. En effet, les animaux supplémentés pesaient plus lourd que ceux du groupe témoin et il semble que plus la masse pondérale d'un animal est élevée, moins il court vite.

Finalement, l'action de la vitamine C à de fortes doses est mal connue et le manque de preuves ne permet pas de conclure.

3.3.2.2. *Action sur les métaux*

L'acide ascorbique, administré de façon concomitante avec du fer favorise l'absorption de celui-ci sous forme d'ions ferreux en milieu acide et favorise, ensuite, son stockage dans la ferritine. Le fer ainsi stocké, étant en équilibre avec le fer cytoplasmique, la quantité de fer libre augmente. Or, le fer est un agent initiateur de réactions d'oxydation et est à l'origine de dégâts importants, en particulier sur les lipides membranaires cellulaires. Par conséquent, le risque de réactions de peroxydation augmente aussi. La vitamine C, par l'intermédiaire de son action sur le métabolisme du fer, peut donc exprimer un pouvoir pro-oxydant.

Certes, une toxicité peut être mise en évidence pour toutes les molécules à activité antioxydantes. Pourtant, utilisées à des doses raisonnables, elles font tout de même partie des molécules ayant une faible toxicité. Leur utilisation reste relativement sûre et justifie leur utilisation en supplémentation.

4. Action combinée des antioxydants ou supplémentation simple

Plusieurs expériences mettent en évidence l'intérêt de supplémenter les carnivores domestiques avec un antioxydant. Il n'est déjà pas facile de comprendre les mécanismes d'action d'une molécule unique. Le problème se complique dès qu'il faut s'intéresser aux effets d'un mélange d'antioxydants. La question qui se pose est de savoir si combiner des antioxydants permet d'obtenir des effets plus ou moins efficaces que ceux des antioxydants seuls.

Selon **CHARLTON *et al.* (2000, b)**, la supplémentation de chats avec un cocktail d'antioxydants (vitamine E, vitamine C...) pendant 9 semaines a permis d'améliorer leur statut antioxydant. Les valeurs de leur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et de leur FRASC (Ferric Reducing Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration) ont été augmentées significativement. Ce type d'expérience semble illustrer l'intérêt de supplémenter avec plusieurs molécules mais n'autorise pas du tout à conclure sur l'action combinée des antioxydants. Cette expérience ne permet pas de comprendre ni d'isoler les effets de chaque molécule seule. Les deux marqueurs du stress oxydatif ne sont pas représentatifs de toutes les réactions se passant dans l'organisme où interviennent les différents antioxydants. Ensuite, les différentes interactions possibles entre les antioxydants n'ont pas été étudiées.

4.1. Les problèmes de compétition pour l'absorption intestinale

L'alimentation de chiens de traîneaux a été enrichie avec 400 UI d' α -tocophérol, 20 mg de lutéine et 3 mg de β -carotène. Grâce à cette supplémentation, **BASKIN *et al.* (2000)** ont montré que les concentrations plasmatiques des deux premières molécules ont été

fortement augmentées : celle d' α -tocophérol a augmenté de 72%, celle de lutéine de 91%. Par contre, les concentrations en β -carotène n'ont été que très faiblement influencées. Avant l'expérience, aucune trace de β -carotène n'était détectable dans le plasma. Après l'enrichissement, sa concentration était de 0.003 μ moles/l. Une des explications possibles pour comprendre cette faible concentration est la suivante : en présence de grande quantité de β -carotène dans la lumière intestinale, la lutéine serait préférentiellement prise en charge par les cellules de la muqueuse. Il existerait une compétition pour l'absorption intestinale, en faveur de la lutéine.

4.2. L'effet d'économie

D'après **BASKIN *et al.* (2000)**, la lutéine, lorsqu'elle est présente en forte concentration par rapport aux autres antioxydants, serait préférentiellement utilisée pour prévenir les dommages oxydatifs. Il existerait ainsi un effet d'économie des autres molécules et en particulier de l' α -tocophérol.

Dans l'expérience de **PIERCY *et al.* (2000)**, les chiens ont été supplémentés en vitamine C, E et β -carotène, pendant 3 semaines. Les concentrations plasmatiques en vitamine E (75.3 μ g/ml pour les chiens supplémentés contre 44.3 μ g/ml pour les chiens du groupe contrôle) ont été plus élevées que celles obtenues à la suite d'autres expériences d'enrichissement utilisant la vitamine E seule. Le β -carotène pourrait avoir contribué à l'augmentation de sa concentration.

4.3. L'action synergique

Les antioxydants ont une action complémentaire contre les radicaux libres. Un antioxydant seul ne suffit pas à protéger les cellules contre la peroxydation lipidique. Le glutathion sous forme réduite et l'acide ascorbique agissent en synergie avec les tocophérols en assurant leur régénération (Figure 34).

En général supplémenter un animal avec un antioxydant permet d'augmenter sa concentration tissulaire ou plasmatique. Pour lutter contre la production de ROS, les molécules antioxydantes agissent en interaction. Augmenter la quantité d'un antioxydant ne permet donc pas forcément d'augmenter de la même façon la résistance de l'organisme au stress oxydatif. L'antioxydant de concentration le plus faible peut être le facteur limitant.

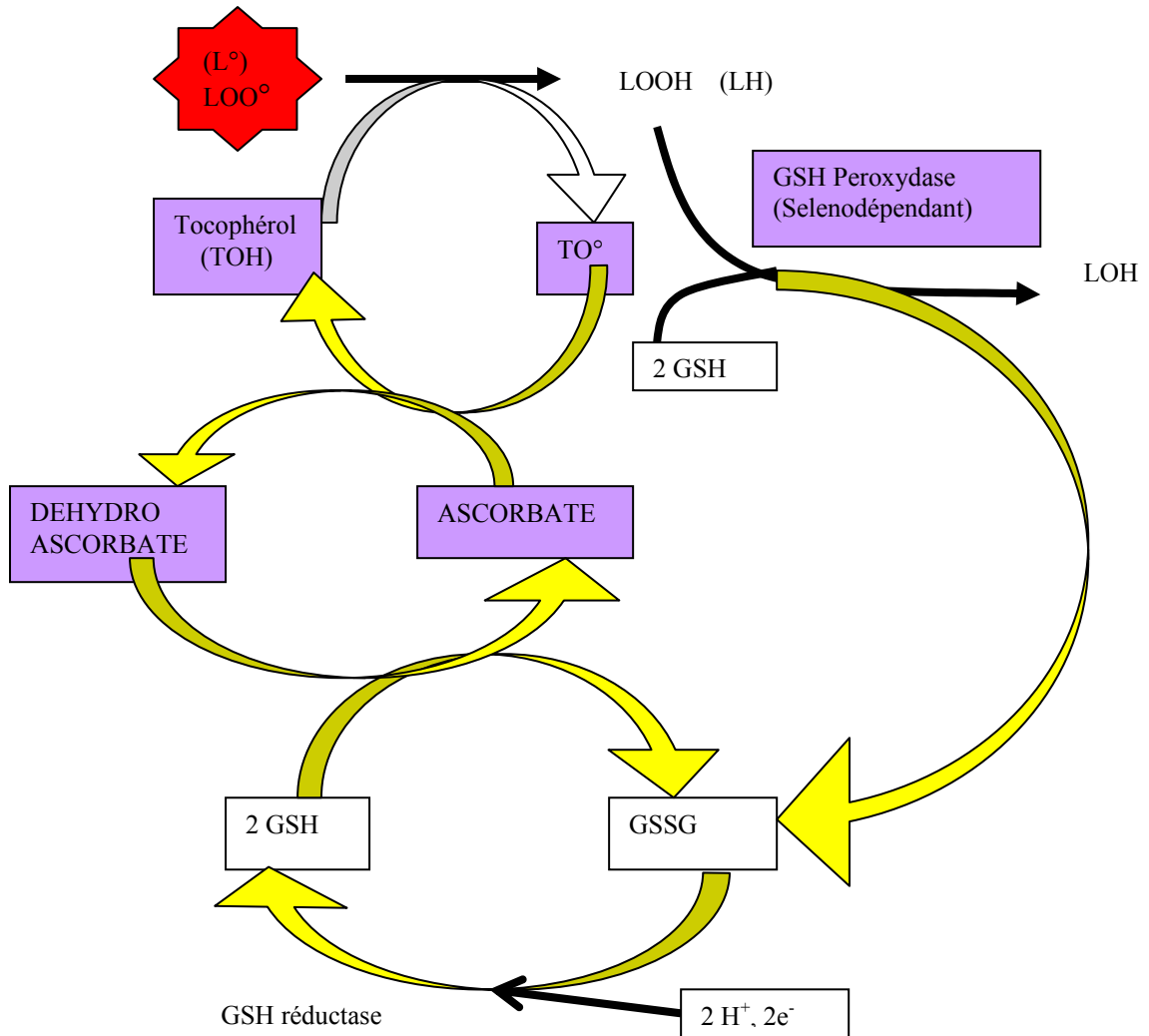


Figure 33. Action synergique des principaux antioxydants

- Antioxydants alimentaires
- Interaction des antioxydants

GSH : Glutathion, GSSG : Glutathion oxydé

Biodisponibilité, toxicité, compétition ou synergie des divers antioxydants utilisables en supplémentation sont les problèmes auxquels doivent répondre les chercheurs. La connaissance de ces données pharmacologiques permettrait d'adapter les apports aux besoins des carnivores domestiques et de choisir leur utilisation en fonction du stress oxydatif.

5. Pratique de la supplémentation

5.1. Mode de supplémentation

A certaines périodes de leur vie, les carnivores domestiques peuvent avoir à faire face à un stress oxydatif. Nous pouvons citer, par exemple, les jeunes autour de la période du sevrage, les animaux vieillissants, les sportifs en période de courses... Ne serait-il pas plus judicieux de supplémenter les animaux durant ces périodes où le risque de stress oxydatif est connu, plutôt que d'utiliser les antioxydants à l'aveuglette ?

La supplémentation ponctuelle pourrait être avantageuse pour les animaux qui vont subir une opération. D'après **O'REILLY *et al.* (2000, b)**, chez le chien, une simple sédation à la médétomidine a été à l'origine d'une diminution des défenses antioxydantes. **BUI *et al.* (2000)** ont démontré qu'il était possible grâce à une supplémentation pendant 4 semaines avec 62.2 UI/400 kcal de vitamine E et 3.3 mg/400 kcal de vitamine C, de prévenir le stress oxydatif induit par une anesthésie générale, chez le chien.

Cependant, la prise ponctuelle d'antioxydants alimentaires n'a pas de sens à court terme car, dès l'arrêt de toute supplémentation, les concentrations ne se maintiennent pas. De plus, pour espérer des effets bénéfiques sur l'organisme en saturant les tissus, un délai minimum d'une semaine est nécessaire. L'obtention de concentrations plasmatiques importantes n'est pas immédiate dès le début de la supplémentation. Il faut prévoir un certain délai entre le début de la supplémentation et le moment où l'on cherche à prévenir le stress oxydatif.

De plus, d'après **MILGRAM *et al.* (2002, a)**, les effets positifs des antioxydants après une courte période de supplémentation (14 jours) ont été moins importants qu'après 6 mois d'enrichissement

Un résultat important des expériences de supplémentation sur le dysfonctionnement cognitif canin lié à l'âge a été l'absence d'effet du régime alimentaire sur les performances des jeunes animaux. Les lésions neuronales induites par le stress oxydatif ne se traduiraient chez l'animal, qu'à partir d'un certain âge. Néanmoins, il ne faut pas conclure trop vite que la supplémentation des jeunes animaux est inutile car les dégâts cellulaires s'accumulent tout au long de la vie.

La question est donc de savoir s'il est plus intéressant d'augmenter les apports en antioxydants des animaux tout au long de leur vie ou de les supplémenter à court terme dans certains cas précis. D'un côté, puisqu'il est généralement admis que les consommateurs d'antioxydants ont moins de risques de développer certaines maladies, les antioxydants sont utilisés pour prévenir un risque potentiel d'apparition de maladies. D'un autre côté, ils sont utilisés pour faire face à un stress oxydatif accru et connu, à un moment donné. Si l'on supplémente chroniquement l'alimentation des carnivores domestiques, il est sûr que leurs besoins pendant des périodes de stress oxydatif accru sont couverts. Mais il vaudrait mieux adapter la supplémentation aux besoins réels et non éventuels des animaux. Un emploi plus raisonné des antioxydants permettrait d'éviter les effets néfastes de leur utilisation excessive. Pourtant, la tendance actuelle semble être plutôt d'enrichir quotidiennement l'alimentation de nos carnivores domestiques en antioxydants.

5.2. Les aliments disponibles dans le commerce

Les aliments du commerce sont de plus en plus enrichis en antioxydants. Leur utilisation est un véritable argument de vente. Ils sont présentés comme des molécules essentielles pour prévenir les dommages oxydatifs cellulaires et ainsi améliorer la santé des carnivores domestiques. Quelques aliments supplémentés sont présentés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14. Analyses moyennes de la teneur en nutriments à activité antioxydante dans quelques aliments pour chiens (d'après les données commerciales).

| | Mn | Zn | Se | Vit E | Vit C | Vit A | β-carotène | Lutéine | Zeaxanthine | Taurine | Poly-phénols |
|-----------------|----|-----|------|-------|-------|-------|------------|---------|-------------|---------|--------------|
| Mini York | 70 | 228 | 0.43 | 600 | 300 | 15000 | | | | | 150 |
| Mini Adult | 70 | 20 | 0.43 | 400 | 300 | 12000 | | | | | - |
| Mini Light | 65 | 195 | 0.43 | 400 | 300 | 12000 | | | | | 150 |
| Mini Mature | 70 | 220 | 0.43 | 400 | 300 | 17000 | | | | | 150 |
| Med Adult | 70 | 220 | 0.43 | 250 | 30 | 10000 | | | | | |
| Medium Sensible | 60 | 190 | 0.43 | 600 | 300 | 15000 | | | | | |
| Labrador | 60 | 250 | 0.25 | 600 | 300 | 22000 | | 5 | 5 | 0.2 | - |
| Berger | 64 | 250 | 0.25 | 600 | 300 | 22000 | | 5 | | 0.22 | - |
| Maxi Adult | 70 | 220 | 0.43 | 400 | 300 | 12000 | | | | 1000 | |
| MaxiSportif4800 | 60 | 200 | 0.25 | 700 | 350 | 25000 | | - | - | 0.22 | - |
| B/d (vieux) | | | | 700 | 70 | 10070 | 1.5 | | | | |
| SP Canin adult | | | | 600 | 70 | 8520 | 1.5 | | | | |

Les valeurs sont exprimées en mg/kg, sauf la vitamine A en UI/kg.

En rouge composition des aliments pour chiens Royal Canin

En bleu composition des aliments pour chiens Hill's

Tableau 15. Analyses moyennes de la teneur en nutriments à activité antioxydante dans quelques aliments pour chats (d'après les données commerciales).

| | Mn | Zn | Se | Vit E | Vit C | Vit A | β-carotène | Lutéine | Zeaxanthine | Taurine | Poly-phénols |
|------------------|----|-----|------|-------|-------|------------|------------|---------|-------------|------------|--------------|
| Babycat Milk | 80 | 23 | 0.43 | 600 | - | 25000 | | | | | |
| Babycat34 | 70 | 230 | 0.25 | 600 | 300 | 22000 | | | | 0.19 | |
| Fit 32 | 56 | 180 | 0.2 | 400 | 30 | 16000 | | | | 0.18 | |
| Hair Skin 33 | 65 | 230 | 0.2 | 400 | 30 | 30000 | | | | 0.15 | |
| Outdoor30 | 62 | 200 | 0.25 | 600 | 300 | 22000 | | | | 0.19 | 150 |
| Mature28 | 70 | 190 | 0.2 | 600 | 300 | 22000 | | | | | 150 |
| Senior26 | 70 | 200 | 0.2 | 600 | 300 | 22000 | | | | | 150 |
| SPChat adult sec | | | | 550 | 70 | 9960-10400 | 0.5 | | | 0.16-0.18% | |

Les valeurs sont exprimées en mg/kg, sauf la vitamine A en UI/kg.

En rouge composition des aliments pour chats Royal Canin

En bleu composition des aliments pour chats Hill's

Beaucoup d'aliments disponibles sont enrichis en antioxydants. Nous avons discuté de l'intérêt d'une telle supplémentation à partir des données expérimentales disponibles, chez les carnivores domestiques uniquement. Cependant, de nombreuses études indiquent que le stress oxydatif est impliqué dans les mécanismes physiopathologiques de différentes maladies, autres que celles auxquelles nous nous sommes intéressés. La plupart des résultats proviennent d'observations épidémiologiques chez l'homme ou chez les rongeurs de laboratoires. C'est principalement à partir de ces études, réalisées dans d'autres espèces, que les fabricants d'aliment justifient l'utilisation des antioxydants aussi en cas d'obésité, de diabète, de calculs urinaires, d'affections rénales, hépatiques, respiratoires et gastro-intestinales, chez les carnivores.

La supplémentation en antioxydants a été choisie de telle façon que :

- les doses restent inférieures aux doses toxiques,
- les doses soient protectrices pour l'animal. L'efficacité de la supplémentation a été évaluée de deux façons. L'enrichissement doit être suffisant pour augmenter le statut antioxydant de l'organisme et permettre de moduler le stress oxydatif.

Pour déterminer les quantités d'antioxydants ajoutés, les formulateurs ont exploité les données de la littérature scientifique actuelle et les expériences de supplémentation animales.

JEWELL *et al.* (2000) ont déterminé les concentrations de vitamine E nécessaires dans un aliment sec pour réduire significativement les lésions cellulaires induites par les radicaux libres. La concentration sérique en alkenals a été utilisée comme marqueur de la peroxydation lipidique. Chez les chiens nourris avec un aliment sec contenant 445 mg de vitamine E/kg, la quantité d'alkenals dans le sérum a été diminuée de façon significative. Chez le chat, une dose de 540 mg de vitamine E/kg de nourriture a entraîné les mêmes effets. De telles expériences ont permis de définir les niveaux de vitamine E utilisables dans les aliments.

Après avoir déterminé les concentrations efficaces pour différents antioxydants, il s'agit de garantir que cette quantité sera effectivement apportée aux animaux. Certaines molécules à activité antioxydantes étant relativement sensibles à leur dénaturation, elles doivent être protégées au sein de l'aliment.

5.3. Formulation des antioxydants dans l'aliment

Un des derniers problèmes rencontrés avec la supplémentation en antioxydants dans les aliments destinée aux carnivores domestiques est leur manque de stabilité durant les procédés de fabrication et le stockage (Tableau 16).

Tableau 16. Principaux facteurs affectant la stabilité de quelques antioxydants

| Antioxydants | Facteurs affectant leur stabilité |
|--------------|---|
| β-carotène | Exposition à l'O ₂ Oxydation catalysée par les ions métalliques, la chaleur et la lumière |
| Vitamine C | Sensible à l'oxydation par l'O ₂ et à la chaleur en solution |
| Vitamine E | Sensible à l'oxydation par la chaleur et les ions métalliques |

Les antioxydants sont principalement sensibles à la chaleur, à l'action de l'oxygène, à la lumière et à l'action de métaux. Les fabricants jouent sur la forme de la molécule ou sur le conditionnement pour les protéger. Ainsi, dans la majorité des études de supplémentation, les expérimentateurs utilisent de l'acétate d' α -tocophéryl stable dans la nourriture et sans aucune activité antioxydante sous cette forme native. Celui-ci doit être hydrolysé dans l'organisme en α -tocophérol pour être absorbé.

Le moment de l'ajout des antioxydants à la formule est aussi important pour éviter leur dénaturation au cours du procédé de fabrication. Ils sont souvent ajoutés en fin de fabrication, en enrobage avec les autres minéraux et aliments.

De la même façon, l'emploi de conditionnements opaques imperméables à l'oxygène, permet de prévenir les oxydations. Ces pertes durant les procédés et le stockage sont pris en compte lors de la réalisation de la supplémentation. C'est une condition finale à l'obtention d'un enrichissement efficace.

Un des enjeux de la réalisation d'un programme de supplémentation est la combinaison d'antioxydants pour obtenir un maximum d'efficacité associée à un maximum de sécurité.

La connaissance des données pharmacocinétiques des différents antioxydants est donc essentielle. Les courbes d'absorption des différentes molécules utilisées ont permis d'étudier la sensibilité des carnivores domestiques à la supplémentation alimentaire. L'étude de la distribution des antioxydants dans les différents tissus et au sein même des cellules a permis de savoir si l'organisme est capable de les concentrer aux sites où il en aurait besoin.

Le principal problème est de trouver les posologies idéales. L'emploi de doses trop élevées peut se révéler toxiques. Il faut aussi se méfier des combinaisons d'antioxydants car il existent des interactions néfastes.

Ensuite se pose la question de la façon dont on va administrer l'aliment supplémenté à l'animal : faut-il enrichir leurs repas toute leur vie ou seulement pendant les périodes à risques ?

La dernière difficulté dans la réalisation pratique de l'enrichissement est de savoir quelle forme de l'antioxydant choisir. Toutes n'ont pas la même activité. Il est possible de jouer sur la forme galénique de la molécule utilisée, la formulation et le conditionnement de l'aliment pour employer la molécule la plus efficace et la mieux absorbée.

En théorie, c'est seulement une fois tous ces problèmes résolus, qu'un enrichissement pourrait être mis en place. Ces données scientifiques sont nécessaires à la réalisation d'un programme de supplémentation précis et rigoureux et éviterait toutes les utilisations abusives et dangereuses des antioxydants. En pratique, ces molécules sont déjà largement ajoutés aux aliments composés des carnivores, et servent d'arguments de vente.

CONCLUSION

L'intérêt de la supplémentation des carnivores domestiques en antioxydants est un problème très complexe. Sa résolution met en jeu trois pôles de recherche, étroitement liés et interdépendants : l'animal, l'antioxydant et les effets recherchés. Chacun d'eux est influencé par divers facteurs. Tout d'abord, les résultats expérimentaux varient en fonction de l'espèce, de la race, de l'âge et du sexe des animaux. De même, selon la nature et la dose de l'antioxydant choisies, ses effets sont variables. Enfin, les bénéfices recherchés par l'enrichissement sont différents si on se place à l'échelle d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme entier.

Cependant, les arguments en faveur de la supplémentation existent. Que ce soit chez l'homme, les rongeurs de laboratoire et les carnivores domestiques, un faisceau de preuves témoignent de leur utilité. Leur utilisation semble cohérente : si les radicaux libres ont une action nocive sur les systèmes biologiques, leur neutralisation par des systèmes antioxydants préviendrait les lésions cellulaires. Le stress oxydatif étant incriminé dans le développement de nombreuses maladies, l'emploi préventif d'antioxydants aurait un effet bénéfique pour la santé. De plus en plus de résultats expérimentaux de supplémentation confirment l'intérêt des compléments alimentaires et vitaminiques pour stimuler la réponse immunitaire, lutter contre les dégâts oxydatifs induits par la pratique d'un effort physique intense ou prévenir le développement de différentes maladies.

Certes, de tels résultats sont prometteurs, mais il ne faut pas s'enthousiasmer trop vite. Des effets délétères consécutifs à l'utilisation d'antioxydants à hautes doses ont été mis en évidence. De plus, dans certains cas, les bénéfices de leur action sont tellement faibles voire nuls que leur supplémentation est remise en question. Enfin, les chercheurs se demandent comment arriver à concentrer les antioxydants au niveau des sites recherchés.

Ce domaine d'étude est ainsi en plein essor et de nombreux travaux sont encore en cours. Le rôle de ces molécules est finalement encore mal connu et les bénéfices de leur utilisation ne semblent pas se résumer à leur action anti-radicalaire. Il est nécessaire de réaliser d'autres études pour comprendre les mécanismes pathogéniques où est impliqué le stress oxydatif, savoir quelle molécule est efficace et comment elle agit. De solides bases scientifiques permettraient d'ajuster finement le programme de supplémentation aux besoins de l'animal, sans craindre d'erreurs.

Une complémentation tout azimut et aléatoire avec des antioxydants n'a pas de sens et peut même se révéler dangereuse. Cependant, il ne faut pas oublier que l'alimentation est un facteur de risque parmi d'autres dans l'occurrence de maladies. Le secret d'une bonne santé reste sans doute dans l'équilibre de la ration et la complémentarité entre les différents nutriments.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLISON RW, LASSEN ED, BURKHARD MJ, LAPPIN MR. Effect of bioflavonoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. *J Am Vet Med Assoc*, 2000, **217**, 1157-1161.
2. (THE) ALPHA-TOCOPHEROL, BÊTA-CAROTENE CANCER PREVENTION STUDY GROUP. The effect of vitamin E and bêta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*, 1994, **330**, 1029-1035.
3. BAKER H, SCHOR SM, MURPHY BD, DEANGELIS B, FEINGOLD S, FRANK O. Blood vitamin and choline concentrations in healthy domestic cats, dogs and horses. *Am J Vet Res*, 1986, **47** (7), 1468-1471.
4. BARROS P, ANGELOTTI A, NOBRE F, MORALES A, FANTONI D, BARROS S. Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. *Vet Ophtalmol*, 1999, **2**, 83-86.
5. BASKIN CR, HINCHCLIFF KW, DISILVESTRO RA, REINHART GA, HAYEK MG, CHEW BP, BURR JR, SWENSON R. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *Am J Vet Res*, 2000, **61**, 886-891.
6. BIOURGE V, GRANDJEAN D, SERGHERAERT R, DRISS F. Vitamin E supplementation in sled dogs. In: *Proceedings of the 17th ACVIM Chicago IL*. 1999, p727 (A).
7. BSAVA. *Manual of Companion Animal Nutrition and Feeding*. United Kingdom: Edited by N Kelly and J Wills, 1996, 280p.
8. BUI LM, RAMSLEY RA, WATTAM S, MARSHALL MD. Altered antioxidant status and induced oxidative damage in small dogs during anaesthesia. *J Vet Intern Med*, 2000, **14**, 388.
9. CAO G, PRIOR RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem*, 1998, **44** (6), 1309-1315.
10. CAO G, VERDON CP, WU A, WANG H, PRIOR R. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem*, 1995, **41** (12), 1738-1744.
11. CARNES CA, CHUNG MK, NAKAYAMA T, NAKAYAMA H, BALIGA RS, PIAO S, KANDERIAN A, PAVIA S, HAMLIN R, MCCARTHY P, BAUER J, VAN WAGONER D. Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodelling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ Res*, 2001, **89**, e32.
12. CESSALI D, JAKONIUK I, BARLUCCHI L, BELTRAMI AP, HINTZE TH, NADALGINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 2001, **89**, 279-286.
13. CHARLTON CJ, MARSHALL MD, O'REILLY JD, SMITH BHE, HARPER EJ. Assay validation and normal ranges of plasma total antioxidant capacity and vitamin C concentrations in cats. *FASEB J*, 2000a; **14** (4), A518, 363.13.

14. CHARLTON CJ, MARSHALL MD, SMITH BHE, O'REILLY J, GROLIER P, PELISSIER TREUNOV E, HARPER EJ. Feeding an antioxidant fortified diet increases the antioxidant capacity of cats. *FASEB J*, 2000b, **14** (4), A749, 521.9.
15. CHARLTON CJ, MARTIN DJ, MARSHALL MD, WATTAM SL, ROBERTSON A, SMITH BHE, O'REILLY JD, HARPER EJ. The influence of age on antioxidant enzyme status in cats. *FASEB J*, 2000c, **14** (4), A518, 363.9.
16. CHARLTON CJ, ROBERTSON AD, MARTIN DJ, SMITH BHE, HARPER EJ. Erythrocyte catalase activity in dogs. *FASEB J*, 2000d, **14** (4), A518, 363.11.
17. CHARLTON CJ, ROBERTSON AD, MARTIN DJ, SKINNER ND, SMITH BHE, HARPER EJ. Erythrocyte catalase activity in cats. *FASEB J*, 2000e, **14** (4), A518, 363.12.
18. CHARLTON CJ, SMITH BHE, O'REILLY J, HARPER EJ. Effect of vitamin C supplementation on the urine pH of cats. *FASEB J*, 2000f, **14** (4), A232, 166.9.
19. CHARLTON CJ, WATTAM SL, MARTIN DJ, MARSHALL MD, SMITH BHE, HARPER EJ. Glutathione peroxidase assay validation and normal ranges in cats. *FASEB J*, 2000g, **14** (4), A518, 363.10.
20. CHARLTON CJ, WATTAM SL, SKINNER ND, HARPER EJ. Validation and normal ranges of plasma ceruloplasmin concentration in cats and dogs. *FASEB J*, 1999, **13** (4), A578, 451.18.
21. CHARLTON CJ, WATTAM SL, SMITH BHE, SKINNER ND. Effect of sample storage on canine haemoglobin determination. *J Vet Intern Med*, 2000h, **14**, 242.
22. CHARLTON CJ, WATTAM SL, SMITH BHE, SKINNER ND, HARPER EJ. Glutathione peroxidase: assay validation and normal range in dogs. *In: SFRR (Europe) Summer meeting*. Dresden, 1999, July 2-5.p033.
23. CHEW BP, PARK JS, WONG TS, WENG B, KIM HW, BYRNE K, HAYEK M, REINHART G. Importance of β -carotene nutrition in the dog and cat: uptake and immunity. *In: REINHART GA, CAREY D, editors. Recent advances in canine and feline nutrition (Vol II)*. Ohio. 1998. 564p.
24. CHEW BP, PARK JS, KIM HW, WONG T, CERVENY C, PARK H, BASKIN C, HINCHCLIFF K, SWENSON R, REINHART G, BURR J, HAYEK M. Effects of heavy exercise and the role of dietary antioxidants on immune response in the Alaskan sled dog. *In: REINHART GA, CAREY D, editors. Recent advances in canine and feline nutrition (Vol III)*. Ohio. 2000a. 582p.
25. CHEW BP, PARK JS, WENG BC, WONG TS, HAYEK MG, REINHART GA. Dietary β -carotene absorption by blood plasma and leukocytes in domestic cats. *J Nutr*, 2000b, **130**, 2322-2325.
26. CHEW BP, PARK JS, WENG BC, WONG TS, HAYEK MG, REINHART GA. Dietary β -carotene is taken by blood plasma and leukocytes in dogs. *J Nutr*, 2000c, **130**, 1788-1791.

27. CHEW BP, PARK JS, WONG TS, KIM HW, WENG BBC, BYRNE KM, HAYEK M, REINHART G. Dietary β -Carotene Stimulates Cell-Mediated and Humoral Immune Response in Dogs. *J Nutr*, 2000d, **130**, 1910-1913.
28. CHRISTOPHER MM, BROUSSARD JD, PETERSON ME. Heinz body formation associated with ketoacidosis in diabetic cats. *J Vet Inter Med*, 1995, **9**, 24-31.
29. COTMAN CW, HEAD E, MUGGENBURG BA, ZICHER S, MILGRAM NW. Brain aging in the canine: a diet fortified in antioxidants reduces cognitive dysfunction. *Neurobiol Aging*, 2002, **23**, 809-818.
30. DAVIDSON MG, GEOLY FJ, GILGER BC, McLELLAN GJ, WHITLEY W. Retinal degeneration associated with vitamin E deficiency in hunting dogs. *JAVMA*, 1998, **213** (5), 645-651.
31. DEVLIN P, KOELSCH S, HEATON PR, CHARLTON CJ, O'REILLY J, SMITH BHE, HARPER EJ. Effects of antioxidant supplementation on the immune response in weaned puppies. *J Vet Med Intern Med*, 2000a, **14**, 361.
32. DEVLIN P, KOELSCH S, HEATON P, SMITH BHE, HARPER EJ. Maintenance of a vaccine induced immune response in adult and senior dogs fed antioxidant supplemented diet. In: Proceedings of the 2000 Purina Nutritional Forum. St Louis MO USA, 2000b oct 19, 22, 157.
33. DI SILVESTRO RA. Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *J Nutr*, 2000, **130**, 1509S-1511S.
34. DONOGHUE S, KRONFELD DS, DUNLAP HL, SCHRYVER HF. Intérêt de la supplementation vitaminique C chez le chien de traîneau en situation de course ou de stress. *Rec Méd Vét*, 1993, **169** (10), 773-777.
35. FICO ME, POIRIER KA, WATRACH AM, WATRACH MA, MILNER JA. Differential effects of selenium on normal and neoplastic canine mammary cells. *Cancer Res*, 1986, **46**, 3384-3388.
36. FORRAT R, DE LORGERIL M, HADDOUR G, SEBBAG L, DELAYE J, FERRERA R. Effect of chronic oral supplementation with α -tocopherol on myocardial stunning in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997, **29** (4), 457-462.
37. FOX PR, TRAUTWEIN EA, HAYES KC, BOND BR, SISON DD, MOISE NS. Comparison of taurine, α -tocopherol, retinal, selenium, and total triglycerides and cholesterol concentrations in cats with cardiac disease and in healthy cats. *Am J Vet Res*, 1993, **54** (4), 563-569.
38. FREEMAN L, BROWN DJ, RUSCH JE. Assesment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Vet Med Assoc*, 1999, **215** (5), 644-646.
39. FRITH NJ, BLOUNT S. Assessment of total antioxidant status in the cat and dog using a fully automated colormetric assay. In: *Proceedings 2nd Annual Conference of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition*. Vienna, 1998, 30.

40. GREELEY EH, KEALY RD, BALLAM JM, LAWLER DF, SEGRE M. The influence of age on the canine immune system. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, **55**, 1-10.
41. HALLIWELL B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 1999, **9**, 1-32.
42. HARPER EJ, CHARLTON CJ, SKINNER ND. Total plasma antioxidant and superoxide dismutase status in dogs: are normal ranges influenced by breed? *FASEB J*, 1999a, **13** (4), A565, 446.17.
43. HARPER EJ, DEVLIN P, HEATON P, KOELSCH S. Feline immunocompetence and the role of antioxidants. North American Veterinary Conference Proceedings, 2001, 249-251.
44. HARPER EJ, FRITH N. Total plasma antioxidants in cats; Normal ranges and influence of age. *FASEB J*, 1999b, **13**, 446.16.
45. HARPER EJ, FRITH NJ, CHARLTON CJ, O'REILLY J, SMITH BHE. Total plasma antioxidants status in kittens. *FASEB J*, 2000, **14** (4), A518, 363.14.
46. HAYEK MG, MASSIMINO SP, BURR JR, KEARNS RJ. Dietary vitamin E improves immune function in cats. In: REINHART GA, CAREY D, editors. *Recent advances in canine and feline nutrition (Vol III)*. Ohio. 2000. 582p.
47. HEATON PR, RANSLEY R, CHARLTON CJ, MANN SJ, STEVENSON J, SMITH BHE, RAWLINGS JM, HARPER EJ. Application of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J Nutr*, 2002a, **132**, 1598S-1603S.
48. HEATON PR, REED CF, MANN SJ, RANSLEY R, STEVENSON J, CHARLTON CJ, HARPER EJ, RAWLINGS JM. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. *J Nutr*, 2002b, **132**, 1720S-1724S.
49. HENNEKENS CH, BURING JE, MANSON JE, STAMPFER M, ROSNER B, COOK NR, BELANGER C, LAMOTTE F, GAZIANO JM, RIDKER P, WILLET W, PETO R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996, **334**, 1145-1149.
50. HILL RC, ARMSTRONG D, BROWNE RW, LEWIS DD, SCOTT KC, SUNDSTROM D, HARPER J. Chronic administration of high doses of vitamin E appear to slow racing greyhounds. *FASEB J*, 2001a, **15**, A990, 756.7.
51. HILL RC, ARMSTRONG D, BROWNE RW, LEWIS DD, SCOTT KC, SUNDSTROM D, HARPER EJ. Some evidence for possible oxidative stress in trained greyhounds after a short sprint race. *FASEB J*, 1999, **13**, 671.
52. HILL AS, O'NEIL S, ROGERS QR, CHRISTOPHER MM. Antioxidant prevention of Heinz body formation and oxidative injury in cats. *Am J Vet Res*, 2001b, **62**, 370-374.
53. HINCHCLIFF KW, PIERCY RJ, BASKIN CR, DISILVESTRO RA, REINHART G, HAYEK M, CHEW BP. Oxidant stress, oxidant damage, and antioxidants review and studies in Alaskan sled dogs. In: REINHART GA, CAREY D, editors. *Recent advances in canine and feline nutrition (Vol III)*. Ohio, 2000, 582p.

54. HINCHCLIFF KW, REINHART GA, DISILVESTRO R, REYNOLDS A, BLOSTEIN-FUJII A, SWENSON RA. Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *Am J Vet Res*, 2000, **61**, 512-517.
55. HIRAYAMA T. Diet and cancer. *Nutr Cancer*, 1979, **1**, 67-81.
56. IMPELLIZERI JA, LAU RE, AZZARA FA. Fourteen week clinical evaluation of an oral antioxidant as a treatment for osteoarthritis secondary to canine hip dysplasia. *Vet Q*, 1998, **20** (S1), S107-S108.
57. JEWELL DE, TOLL PW, WEDEKIND KJ, ZICKER SC. Effect of increasing dietary antioxidants on concentrations of vitamin E and total alkenals in serum of dogs and cats. *Vet Ther*, 2000, **1** (4), 264-272.
58. KEARNS RJ, LOOS KM, CHEW BP, MASSIMINO S, BURR JR, HAYEK MG. The effect of age and dietary β -carotene on immunological parameters in the dog. In: REINHART GA, CAREY D, editors. *Recent advances in canine and feline nutrition (Vol III)*. Ohio. 2000. 582p.
59. KIM HW, CHEW BP, WONG TS, PARK JS, WENG BBC, BYRNE KM, HAYEK MG, REINHART GA. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000a, **74**, 315-327.
60. KIM HW, CHEW BP, WONG TS, PARK JS, WENG BBC, BYRNE KM, HAYEK MG, REINHART GA. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 2000b, **73**, 331-341.
61. KOELSCH S, SMITH BHE. Strengthening the barriers against feline infectious diseases: the benefits of antioxidants. *Waltham focus*, 2001, **11**, 2.
62. KORYTKO PJ, RODVOLD KA, CROWELL JA, STACEWICZ-SAPUNTZAKIS M, DIWADKAR-NAVSARIWALA V, BOWEN PE, SCHALCH W, LEVINE BS. Pharmacokinetics and tissue distribution of orally administered lycopene in male dogs. *J Nutr*, 2003, **133**, 2788-2792.
63. LE MOEL G, SAVEROT-DAUVERGNE A, GOUSSON T. *Le statut vitaminique*. France : Editions Médicales Internationales, 1998, 550p.
64. MARSHALL RJ, SCOTT KC, HILL RC, LEWIS DD, SUNDSTROMD, JONES GL, HARPER J. Supplemental vitamin C appears to slow racing Greyhounds. *J Nutr*, 2002, **132**, 1616S-1621S.
65. MAZUR A, BAYLE D, ROCK AM, CHARLTON CJ, HARPER EJ, TREUNOV E, ROCK E, PELISSIER TREUNOV E. Oxidizability of the cat low density lipoproteins. *FASEB J*, 2000, **14** (4), A451, 326.5.
66. MEYDANI M, WU D, HAYEK MG, MARTIN KR, MEYDANI SN. Effect of vitamin E (E) supplementation on plasma and immune response of young and old beagle dogs. *FASEB J*, 1998, **12**, A840, 4866.
67. MILGRAM NW, HEAD E, COTMAN CW, MUGGENBURG B, ZICKER S. Dysfonctionnement cognitif lié à l'âge chez le chien: approches diététiques. In: KL Overall,

SE Heath, D Horwitz (Eds). Proceedings of the third International Congress on Veterinary Behavioural Medicine. Vancouver, August 2001. Wheathampstead, UK, Universities Federation for Animal Welfare, 2001, p. 53-57.

68. MILGRAM N, HEAD E, MUGGENBURG B, HOLOWACHUK D, MURPHEY H, ESTRADA J. Landmark discrimination learning in the dog : effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy. *Behav Neurosci*, 2002a, **26**, 679-695.

69. MILGRAM NW, ZICKER SC, HEAD E, MUGGENBURG BA, MURPHEY H, IKEDA-DOUGLAS CJ, COTMAN CW. Dietary enrichment counteracts age-associated cognitive dysfunction in canines. *Neurobiol Aging*, 2002b, **23**, 737-745.

70. MOON RC. Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemoprotective agents for cancer. *J Nutr*, 1989, **119**, 127-134.

71. MOQUET N. Le stress oxydatif membranaire d'effort chez le chien. Impact sur le statut antioxydant et le besoin vitaminique E chez le chien de traîneau en course de longue distance. Thèse Méd Vét, Alfort, 2000, n° 074, 59p.

72. OBRA R, HARPER EJ, LUNEC J. Exercise in healthy adult dogs increases plasma TBARS- an indicator of oxidative stress. *FASEB J*, 1999, **13** (4), A565, 446.18.

73. OPARA, E.S. Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications. *J of the Royal Soc for the promotion of Health*, 2002, **122**, 28-34.

74. O'REILLY J, CHARLTON CJ, NIEKERK A, SMITH BHE, HARPER EJ. Diets high in vitamin E affect haemostasis in cats. *FASEB J*, 2000a, **14** (4), A40, 45.3.

75. O'REILLY J, CHARLTON CJ, SMITH BHE, HARPER EJ. Mild sedation causes oxidative stress in domestic dogs. *FASEB J*, 2000b, **14** (4), A200, 144.13.

76. PALMER HJ, PAULSON KE. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Signal Transduction and Gene Expression. *Nutr Rev*, 1997, **55** (10), 353-361.

77. PIERCY RJ, HINCHCLIFF KW, DISILVESTRO RA, REINHART GA, BASKIN CR, HAYEK MG, BURR JR, SWENSON RA. Effect of dietary supplements containing antioxidants on attenuation of muscle damage in exercising sled dogs. *Am J Vet Res*, 2000, **61**, 1438-1445.

78. PILLAI SR, TRABER MG, STEISS JE, KAYDEN HJ, COX NR. α -Tocopherol Concentrations of the Nervous System and Selected Tissues of Adult Dogs Fed Three Levels of Vitamin E. *Lipids*, 1993, **28** (12), 1101-1105.

79. PION PD, KITTLESON MD, ROGERS QR, MORRIS JG. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science*, 1987, **14**, 764-767.

80. PODMORE ID, GRIFFITHS HR, HERBERT KE, MISTRY N, MISTRY P, LUNEC J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 1998, **392**, 559.

81. ROTH M. Carotenoids affect development of UVB induced skin cancer. *Photochem Photobiol*, 1987, **46**, 507-509.

82. RUSSEL RM, MAYER J. The Enigma of β -Carotene in Carcinogenesis: What Can Be Learned from Animal Studies. *J Nutr*, 2004, **134**, 262S-268S.
83. SATO R, INANAMI O, SYUTO B, SATO J, KUWABARA M, NAITO Y. The plasma superoxide scavenging activity in canine cancer and hepatic disease. *J Vet Med Sci*, 2003, **65** (4), 465-469.
84. SEBBAG L, FORRAT R, CANET E, RENAUD S, DELAYE J, DE LORGERIL M. Effects of Dietary Supplementation With Alpha-Tocopherol on Myocardial Infarct Size and Ventricular Arrhythmias in a Dog Model of Ischemia-Reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1994, **24**, 1580-1585.
85. SCOTT KC, HILL RC, LEWIS DD, BONING JR, SUNDSTROM DA. Effect of α -tocopheryl acetate supplementation on vitamin E concentrations in Greyhounds before and after a race. *Am J Vet Res*, 2001, **62**, 1118-1120.
86. SKINNER ND, CHARLTON CJ, EBBRELL SL, HARPER EJ. Canine ferritin: assay validation and normal range for serum. *FASEB J*, 1999, **13** (4), A246, 217.15.
87. SMITH BHE, DEVLIN P. Enhancing puppy immune response through diet. *Waltham focus*, 2000, **10** (4), 32-33.
88. SNOW DH, FRIGG M. Plasma concentration of some vitamins in greyhounds. *Small Anim Pract J*, 1990, **31**, 605-609.
89. VASANKARI T, KUJALA U, HEINONEN O, KAPANEN J, AHOTUPA M. Measurement of serum lipid peroxidation during exercise using three different methods: diene conjugation, thiobarbituric acid reactive material and fluorescent chromolipids. *Clin Chim Acta*, 1995, **234**, 63-69.
90. WATKINS BA, TUREK JJ, LEPINE AJ, ALDRICH CG, HAYEK MG. Relationships of fat quality and antioxidants in bone and cartilage. In: REINHART GA, CAREY D, editors. *Recent advances in canine and feline nutrition (Vol III)*. Ohio. 2000. 582p.
91. WATERS DJ, SHEN S, COOLEY DM, BOSTWICK DG, QIAN COOMBS GF, GLICKMAN LT, OTEHAM C, SCHLITTLER L, MORRIS JS. Effects of Dietary Selenium Supplementation on DNA Damage and Apoptosis in Canine Prostate. *J Natl Cancer Inst*, 2003, **95**, 237-241.
92. WEDEKIND KJ, ZICKER S, LOWRY S, PAETAU-ROBINSON I. Antioxidant status of adult beagles is affected by dietary antioxidant intake. *J Nutr*, 2002, **132**, 1658S-1660S.