

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en français : Stress oxydant chez le cheval de compétition :
marqueurs biochimiques et leur modulation nutritionnelle

Titre de la thèse en anglais : Oxidative stress in competition horses: biochemical markers
and their nutritional modulation

Candidat : Briec de Moffarts

Promoteur : Prof. Pierre Lekeux

Département et Service : Département des Sciences fonctionnelles, Secteur de Physiologie

Date de la défense publique : le 28 septembre 2005

Composition du Jury : *Membres extérieurs à la faculté :*
J. Piette, P. Deprez
Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :
P. Lekeux, N. Kirschvink, J. Pincemail, T. Art, JM. Godeau, M. Diez, P Gustin, D Serteyn

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les antioxydants et la charge pro-oxydante en faveur de cette dernière (Sies, 1991). Les pro-oxydants sont, généralement, des formes réactives de l'oxygène (FRO). Ces FRO sont générées entre-autres dans les mitochondries lors du transfert d'électrons, dans les cellules phagocytaires lors d'un processus inflammatoire et au cours de processus physiologiques d'oxydo-réduction. Les FRO sont capables d'oxyder les protéines, les bases constitutives du matériel génétique et les hydrates de carbone, ainsi que les lipides membranaires (Thannickal et Fanburg, 2000).

En condition physiologique, le pouvoir oxydant des FRO est contrebalancé par de nombreux antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.

Le stress oxydant a été mis en évi-

dence dans de nombreuses pathologies en médecine humaine (pour revue Babior, 2000). Chez le cheval, plusieurs études suggèrent que le stress oxydant joue un rôle dans certaines entités pathologiques, à savoir l'hémorragie pulmonaire induite par l'exercice (Derksen, 1997), l'inflammation persistante des voies respiratoires profondes (Mills *et al.*, 1996 ; Art *et al.*, 1999 ; Kirschvink *et al.*, 2001), certains types de myopathies (Löfstedt, 1997) ainsi que dans des troubles du système nerveux (pour revue Siso *et al.*, sous presse).

Depuis l'étude de Davies *et al.* (1982) démontrant que l'exercice physique augmente la génération de FRO dans l'organisme, de nombreuses études ont démontré chez l'homme et chez plusieurs espèces animales que l'exercice induit un stress oxydant (pour la synthèse : Leeuwenburgh et Heinecke, 2001). Les données relatives aux facteurs capables d'influencer le stress

oxydant induit par l'exercice indiquent que ce dernier dépend de l'intensité et du type d'effort, de l'entraînement, de l'alimentation, des circonstances de l'exercice (entraînement ou compétition), de l'âge de l'individu, etc. (Ji *et al.*, 1998).

Dans l'espèce équine, les études suggèrent que l'exercice induit un stress oxydant. Néanmoins, des études investiguant de façon systématique un ensemble des facteurs influençant le stress oxydant induit par l'exercice ne sont pas décrites chez le cheval.

Utiliser un apport supplémentaire en antioxydants s'avère intéressant pour rétablir l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants en faveur de ces derniers. Bien qu'il soit démontré que les antioxydants endogènes sont indispensables à la prestation d'un exercice physique (Leeuwenburgh et Ji, 1995), les besoins spécifiques en suppléments antioxydants sont peu connus chez le sportif (Clarkson et Thompson, 2000).

La modulation du stress oxydant, induit au cours de l'exercice, par des antioxydants semble cependant possible chez l'homme, chez des animaux de laboratoire ainsi que chez le cheval (Deaton et Marlin, 2005).

Dès lors, le stress oxydant induit par l'exercice apparaît comme une entité importante en médecine sportive chez l'homme qui, par contre, est encore peu étudiée en médecine sportive équine. Le cheval de sport étant exposé de façon importante au stress oxydant induit par l'exercice, il semble intéressant d'étudier : 1) Les facteurs influençant ce stress oxydant et 2) la modulation de ce stress oxydant au moyen d'une adjonction ciblée d'antioxydants par voie orale.

Les études réalisées dans le cadre de cette thèse devraient contribuer à l'établissement d'une base fondée du stress oxydant chez le cheval de sport.

RÉSULTATS

Les facteurs étudiés, influençant le stress oxydant ont été : (i) l'exercice intense de courte durée dans différentes disciplines, (ii) comparé à un exercice intense jusqu'à fatigue, (iii) l'entraînement, (iv) ainsi que la saison de courses chez les galopeurs. Les marqueurs oxydants et antioxydants ont été déterminés dans le sang.

(i) L'effet de l'exercice a été significatif pour certains marqueurs. Chez le trotteur, étudié en condition de laboratoire (TL), sur tapis roulant, et au cours de plusieurs tests d'effort, l'exercice induit une modification significative du système glutathion, à savoir : une diminution du glutathion réduit (GSH) au maximum de l'effort ainsi que durant le premier quart d'heure de la phase de récupération. Au maximum de l'effort, le glutathion redox ratio ($GRR = GSSG/GSH + GSSG$) a augmenté significativement ; augmentation suivie lors de certains tests, par une augmentation concomitante du glutathion oxydé (GSSG), durant la phase de récupération. Ces résultats

ont été confirmés chez des chevaux de concours complet (CCE) testés sur le terrain, chez lesquels une diminution significative du GSH et une augmentation significative du GRR ont été observées après 15 min de récupération. Les antioxydants hydrophiles ont augmenté significativement chez des trotteurs testés en conditions TL et sur un terrain de course (TT) ainsi que chez les chevaux de concours complet. Effectivement, l'acide urique (AU) était significativement plus élevé au cours de la phase de récupération (TL, TT, et CCE :15 min ainsi que pour TL, 60 min après l'effort). L'augmentation de l'acide ascorbique (AA) a été significative durant la phase de récupération : TL et TT 15 min après l'effort et pour TL 60 min. Au vu des corrélations significatives entre l'AA et la capacité antioxydante hydrophile du plasma (ACW), celle-ci a également augmenté significativement (mesure réalisée chez TL 15 min après l'effort). La mesure supplémentaire réalisée 24 heures après l'effort chez les CCE a permis de mettre en évidence l'augmentation significative de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx), l'augmentation de l'oxydation des protéines (Protox) ainsi que la diminution de la vitamine E et de la fluidité membranaire des globules rouges (EMF).

(ii) Au vu de la comparaison entre l'exercice intense et jusqu'à fatigue réalisés sur tapis roulant par les TL, les résultats indiquent que les variations observées au cours des premiers tests a été significativement plus importantes lorsque l'exercice se déroulait jusqu'à fatigue. Ce résultat était significatif pour l'AA, l'AU et le GSH. Cette comparaison a également permis de mettre en évidence un autre effet de l'exercice, à savoir une chute significative de la GPx observée 48 heures après l'exercice chez le TL.

(iii) En plus de l'augmentation significative de la consommation d'oxygène, après respectivement quatre et douze

semaines d'entraînement réalisé par les TL, des variations significatives de plusieurs marqueurs ont été observées. Effectivement, les marqueurs suivants ont augmenté en concentration ou en activité : l'AU, le selenium (Se), le cuivre (Cu), la superoxyde dismutase (SOD) et la GPx. Au contraire, la Vit E, le GSSG et le GRR avaient diminué significativement après quatre semaines d'entraînement. Une corrélation intéressante est à souligner : une corrélation positive et significative entre l'augmentation de l'activité de la SOD au cours de l'entraînement et l'amélioration de la capacité aérobie (VO_{2max}) du cheval a été observée.

(iv) Le suivi de dix galopeurs au cours de la deuxième moitié de la saison de courses a permis de mettre en évidence une chute significative des concentrations ou de l'activité de la SOD, de la GPx, du Se et du GSH. Une augmentation significative du GSSG, du GRR, de l'ACW, de l'AA et du β -carotène a été observée.

L'étude de modulation du stress oxydant a été réalisée au moyen de deux protocoles distincts. (i) L'étude de l'impact d'un complexe antioxydant sur les paramètres du stress oxydant chez des pur-sang en saison de courses et (ii) l'étude de l'impact d'un complexe antioxydant enrichi en acides gras de type oméga 3 sur les variables du stress oxydant, chez le cheval de complet, au repos et à l'exercice.

(i) L'étude de l'effet d'un complément antioxydant sur le stress oxydant induit par la succession des exercices subis par des chevaux en condition de terrain a pu être entreprise grâce à la détermination des marqueurs sanguins chez des galopeurs entraînés ($n = 40$) au cours de trois mois d'investigation. Deux groupes de chevaux ont été formés au hasard ; un groupe contrôle a reçu un placebo ($n = 10$) et un groupe «antioxydant» ($n = 30$) a été complété par voie orale avec un mélange composé d'antioxydants. Le mélange était composé d'acide ascor-

bique, d' α -tocophérol, de β -carotène, de Cu, de Zn et de Se. La concentration des différents marqueurs sanguins a été déterminée avant ainsi qu'après 6 et 12 semaines de complémentation. Les résultats de cette étude montrent que la complémentation a permis de prévenir la diminution de la GPx et du Se observée chez les chevaux recevant le placebo. En outre, elle a permis d'augmenter la ACW, la Vit E, le β -carotène et la capacité antioxydante lipophile de plasma (ACL) chez les chevaux traités.

(ii) L'impact d'un complexe antioxydant enrichi en acides gras de type oméga 3 sur les marqueurs du stress oxydant a été étudié sur 12 chevaux de concours complet. Deux groupes de chevaux ont été formés au hasard; un groupe contrôle a reçu un placebo (n = 6) et un groupe «antioxydant» (n = 6) a été complémenté par un mélange composé de Vit E, d'orotate de cuivre et d'extrait d'huile de poisson. La concentration des différents marqueurs sanguins a été déterminée avant ainsi qu'après 21 jours de complémentation ainsi que 15 min et 24 heures après un test d'effort de terrain. Les résultats mesurés au repos montrent que la complémentation a permis, non seulement d'augmenter le rapport oméga 3/6 tant plasmatique que membranaire dans le groupe traité, de prévenir la diminution de la GPx mais aussi de prévenir l'augmentation du rapport cuivre/zinc (Cu/Zn) observée chez les chevaux recevant le placebo. Alors qu'au cours de l'exercice, l'EMF diminue dans le groupe placebo 15 min après l'exercice, l'EMF reste stable chez les chevaux traités.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude des paramètres d'influence du stress oxydant. Ce chapitre a confirmé que l'exercice induit un stress oxydant chez le cheval de sport. Il peut donc être mis

en évidence au moyen du dosage de plusieurs marqueurs oxydants sanguins. De plus, il semble dépendre du type d'exercice, de l'intensité de l'exercice, du degré d'entraînement du cheval, des conditions expérimentales ainsi que d'un ensemble de facteurs intervenant au cours d'une saison de course ou de travail.

Il ressort que l'exercice intense et de courte durée induit un stress oxydant chez le cheval. Ce stress oxydant peut se répercuter rapidement (durant l'heure suivant l'effort) sur les éléments au groupement thiol (GSH/GSSG), l'AU et l'AA. À moyen terme (durant les heures suivant l'effort), l'exercice influence également l'activité de la GPx, les concentrations en Vit E ainsi que l'oxydation des protéines. Les paramètres du stress oxydant ayant variés au cours de l'exercice varient d'autant plus que l'intensité de l'effort est grande. L'entraînement, quant à lui, permet d'améliorer, en parallèle de la capacité physique, le statut antioxydant du cheval. La chute de vit E, observée au cours de la première partie de cet entraînement, rappelle l'importance du suivi de la ration alimentaire. La saison de courses est un facteur important qui influence de manière multifactorielle l'équilibre oxydant-antioxydant des chevaux.

De façon générale, le système glutathion est un élément important dans le suivi des chevaux de sport, tant à l'exercice qu'au cours des périodes d'entraînements. L'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes, telles que la SOD ou la GPx semble être intéressante dans le suivi des réponses au stress oxydant. Au cours de l'exercice, les antioxydants hydrophiles semblent évoluer en fonction de l'intensité et pourraient être utilisés afin de mieux qualifier un test quant à son intensité. L'évaluation des marqueurs de l'oxydation devra faire l'objet de travaux complémentaires afin de continuer à qualifier le stress oxydant dans différentes conditions.

L'évaluation de la fluidité membranaire des globules rouges chez le cheval de sport et de courses en particulier, devrait être entreprise de manière plus approfondie.

La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de la modulation du stress oxydant. Elle a mis en évidence la capacité d'un mélange d'antioxydants à améliorer les capacités antioxydantes hydrophile, lipophile et enzymatique du sang.

Des résultats apportés par l'étude sur les galopeurs complémentés et suivis au cours d'une saison de courses, il ressort que ceux-ci subissent des changements significatifs de leur balance antioxydante au cours d'une période de courses et qu'une complémentation adéquate peut partiellement les contrebalancer par l'augmentation des capacités antioxydantes hydrophile, lipophile et enzymatique du sang.

L'étude réalisée avec les chevaux de concours complet a montré que l'exercice pouvait induire un stress oxydant, aussi marqué par une diminution de l'EMF, mais indique également qu'un mélange combiné d'antioxydants et d'acides gras de type oméga 3 peut moduler en partie les variations induites par l'exercice. La possibilité de moduler la fluidité membranaire des globules rouges, lors de l'administration concomitante d'acides gras polyinsaturés et d'antioxydants, invite à poursuivre les investigations sur ce marqueur.

De façon générale, il semble que la biodisponibilité plasmatique relative des éléments d'un mélange est variable, en fonction de l'élément administré, mais également de paramètres tels que l'absorption (active ou passive), la redistribution, la métabolisation ou encore l'élimination des éléments. Les vitamines liposolubles se retrouvent généralement dans le plasma, ainsi que la vit C, mais de façon moins flagrante. Les concentrations plasmatiques en oligo-éléments sont difficiles à faire varier, exception faite du

Se. Ces résultats rendent compte de l'énorme complexité des mécanismes de régulation de ces concentrations pour assurer une homéostasie correcte du système oxydant/antioxydant. L'adjonction d'antioxydants a permis de faire évoluer les capacités antioxy-

dantes du plasma. La modulation de l'activité de la GPx semble, entre autre, être sous la dépendance directe de son catalyseur alors qu'aucune variation de l'activité de la SOD n'a été constatée suite aux traitements ins-

taurés. Les variables du stress oxydant semblent pouvoir être modulées à l'aide de compléments alimentaires administrés par voie orale, tant au cours d'une saison de travail que durant un exercice.

REFERENCES

- ARTT., KIRSCHVINK N., SMITH N., LEKEUX P. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Vet. J.*, 1999, **31**, 397-401.
- BABIOR B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 2000, **109**, 33-44.
- CLARKSON P.M., THOMPSON H.S. Antioxidants : what role do they play in physical activity and health ? *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **72 (Suppl 2)**, 637S-646S.
- DAVIES K.J., QUINTANILHA A.T., BROOKS G.A., PACKER L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1982, **107**, 1198-1205.
- DEATON C.M., MARLIN D.J. Reactive oxygen species and antioxidants - a war of nutrition. *Vet. J.*, 2005, **169**, 7-9.
- DERKSEN F.J. Oxidant injury and nitric oxide: a role in exercise-induced pulmonary haemorrhage ? *Vet. J.*, 1997, **153**, 119-122.
- JI L.L., LEEUWENBURGH C., LEICHTWEIS S., GORE M., FIEBIG R., HOLLANDER J., BEJMA J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998, **854**, 102-117.
- KIRSCHVINK N., SMITH N., FIÉVEZ L., ART T., MARLIN D., ROBERTS C., LEKEUX P. Effect of chronic airway inflammation and exercise on pulmonary and systemic antioxidant status of healthy and heaves-affected horses. 2nd World Equine Airways Symposium and 19th Comparative Respiratory Society Meeting, Edinburgh, Scotland, Oral presentation, 2001, p. 55.
- LEEUWENBURGH C., JI L.L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **316**, 941-949.
- LEEUWENBURGH C., HEINECKE J.W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr. Med. Chem.*, 2001, **8**, 829-838.
- LÖFSTEDT J. White muscle disease of foals. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 1997, **13**, 169-185.
- MILLS P.C., ROBERTS C.A., SMITH N.C. Effect of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 1359-1363.
- SIES H. Oxidative stress: introduction. In : Sies H. (Eds.), *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*. Academic Press : London, 1991, xv-xxii.
- SISÓ S., HANZLÍEK D., FLUEHMANN G., KATHMANN I., TOMEK A., PAPA V., VANDELDELDE M. Neurodegenerative diseases in domestic animals: a comparative review. *Vet. J.*, 2005, **169**, sous presse.
- THANNICKAL V.J., FANBURG B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, **279**, L1005-L1028.

Publications issues du travail de thèse

DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., MICHAUX C., CAYEUX K., DEFRAIGNE J-O., LEKEUX P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *ECEP*, 2004, **1**, 211-220.

DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., LEKEUX P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, 2005, **169**, 65-74.

DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., VAN ERCKE., ART T., PINCEMAIL J., LEKEUX P. Assessment of the oxidant-antioxidant blood balance in a field exercise test in standardbred and eventing horses. Soumis pour publication.

DE MOFFARTS B., PORTIER K., KIRSCHVINK N., COUDERT J., FELLMANN N., VAN ERCK E., LETELLIER C., MOTTA C., PINCEMAIL J., ART T., LEKEUX P. Effects of exercise and oral antioxidant supplementation enriched in (n-3) fatty acids on blood oxidant markers and erythrocyte membrane fluidity in horses. En préparation.

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette thèse a été possible grâce au FRIA et au FNRS, à l'ULg, à PROBIOX SA et PAVESCO AG.