



institut français  
du **cheval**  
et de l'**équitation**



**43<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine**  
**Jeudi 16 mars 2017**

## **Maintien de l'intégrité musculaire et articulaire : les bénéfices de la Superoxyde Dismutase végétale**

F.Barbé<sup>1</sup>, A. Sacy<sup>1</sup>, Y. Le Treut<sup>1</sup>, C. Lennen<sup>2</sup>, M. Lindinger<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Lallemand SAS, 19 rue des Briquetiers, BP 59, 31702 BLAGNAC cedex

<sup>2</sup>Ovvet Group, Unit 1056 Moulton Park, Deer Park Road, Northampton, England, NN3 6RX

<sup>3</sup>The Nutraceutical Alliance, 10526 4<sup>th</sup> Line, Campbellville, ON, Canada, LOP 1B0

### **Résumé**

Les chevaux athlètes sont souvent exposés à un stress oxydant et inflammatoire, conduisant à une **fragilisation des membranes musculaires et à une dégradation du cartilage articulaire**. L'objectif de cette étude est de déterminer l'effet d'une supplémentation en antioxydant primaire (Superoxyde Dismutase, SOD) sur différents biomarqueurs de l'inflammation (PGE2, NO) et du statut oxydant (TAS, activité SOD) dans le plasma et le liquide synovial et sur des biomarqueurs indicateurs de l'intégrité du cartilage (GAG) et des muscles (CRE et enzymes musculaires CK, AST, ALP, GGT). 2 groupes de 8 chevaux ont reçu un placebo ou une supplémentation de SOD végétale (2600 UI/cheval/jour) pendant 23 jours et ont été soumis à un exercice intense normalisé induisant un stress oxydant et une inflammation modérée, sur 2 périodes (pré- et post-supplémentation). **L'exercice intense a conduit à une augmentation de l'inflammation dans le liquide synovial, à une dégradation de la matrice cartilagineuse et à une augmentation dans le plasma des activités enzymatiques des enzymes présentes normalement dans le muscle, indicateur d'une fragilisation des membranes musculaires. La supplémentation en SOD végétale a permis de maintenir l'intégrité musculaire et articulaire et de réduire le stress oxydant et l'inflammation en stimulant l'activité enzymatique SOD dans le liquide synovial.** Ce modèle ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la supplémentation en antioxydants primaires permettant de maintenir l'intégrité musculaire et articulaire des chevaux athlètes et/ou souffrant de pathologies articulaires.

**Mots clés : cheval, antioxydant primaire, stress oxydant, inflammation, articulation**

### **Summary**

Athletic horses are often subjected to oxidative stress and inflammation, leading to muscle membrane weakening and degradation of the cartilage matrix in joints. The objective of this study is to investigate the effects of a primary antioxidant (Superoxide Dismutase, vegetal SOD) on biomarkers of inflammation (PGE2, NO) and oxidative status (TAS, SOD activity) in plasma and synovial fluid as well as on biomarkers related to cartilage integrity (GAG) and muscle integrity (CRE and muscular enzymes CK, AST, ALP, GGT). 2 groups of 8 horses received either a placebo or a supplementation of vegetal SOD (2600 IU/horse/day) during 23 days and were submitted to a standardized exercise test designed to result in mild-to-moderate oxidative stress and inflammation, during 2 sessions (pre- and post-supplementation). This model of exercise induced inflammation in synovial fluid, degradation of cartilage matrix and leakage of muscular enzymes in the plasma, indicative of muscle membrane weakening. Supplementing horses with vegetal SOD helped to maintain muscular and cartilage integrity and decreased oxidative stress and inflammation by stimulating SOD enzymatic activity in the synovial fluid. This model highlights also beneficial effects of primary antioxidant supplementation to maintain muscle and joint integrity in athletic horses or horses suffering from degenerative joint disease.

**Key-words: horse, primary antioxidant, oxidative stress, inflammation, joint**



## Introduction

Une activité physique intense est une source majeure de stress oxydant chez le cheval. En effet, la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) affecte la résistance du cheval au niveau musculaire et articulaire. Dans les muscles, le stress oxydant et les inflammations perturbent le fonctionnement des membranes des cellules musculaires et les affaiblissent progressivement, libérant ainsi des enzymes intracytoplasmiques (CK, ASAT) dans le sang. Il a été montré qu'un exercice intense est souvent associé à une altération et des microtraumatismes des membranes musculaires (Kanter *et al.*, 1988). Dans les articulations, ces déséquilibres oxydants se manifestent par une augmentation des marqueurs de l'inflammation (prostaglandine E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> ; monoxyde d'azote, NO) et une augmentation de la présence de composants de la matrice cartilagineuse (glycosaminoglycanes, GAG) dans le liquide synovial (Pearson *et al.*, 2009), témoignant de l'agression du cartilage et pouvant conduire à de l'inconfort voire de la douleur chez le cheval. Les GAG participent à la résistance à la compression grâce à leur liaison ionique avec l'eau. Leur présence dans le liquide synovial reflète ainsi une altération du cartilage qui induit une réduction de son élasticité et de sa capacité à supporter et transmettre les forces efficacement. Ces marqueurs sont donc des indicateurs précieux de l'intégrité des muscles et des articulations et donc de l'avenir sportif du cheval.

En 2015, un modèle de fatigue articulaire a été développé au Canada, afin d'investiguer l'importance du stress oxydant et de l'inflammation produits lors d'un effort physique intense et d'évaluer l'intérêt d'un antioxydant primaire : la superoxyde Dismutase (SOD). Cette enzyme, la seule capable de transformer (dismuter) l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, permet de préserver l'équilibre oxydo-réducteur et donc de maintenir l'intégrité des structures cellulaires. L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact d'un exercice intense et d'une supplémentation en SOD végétale sur différents biomarqueurs du liquide synovial et du plasma, indicateurs de la balance oxydative, de l'inflammation et de l'intégrité des membranes.

## 1 Matériels et méthodes

### 1.1 Dispositif expérimental et paramètres mesurés

2 groupes de 8 chevaux ont été intégrés dans l'étude (Canada, 2015) : 8 chevaux ont reçu un placebo (groupe Témoin, T : 8,1 ans ; 541 kg) et 8 chevaux ont reçu une supplémentation de superoxyde dismutase (groupe SOD, S : 8,5 ans, 546 kg – Melofeed®, Lallemand SAS, 2600UI/cheval/jour) ajouté à l'aliment pendant 23 jours. Chaque cheval a effectué 2 exercices (24h avant et à la fin de la période de supplémentation). L'exercice a consisté en 4 courses à plein galop dans la boue sur 800 mètres avec une marche au repos de 4 min entre chaque course, l'effort étant régulé sur la base du rythme cardiaque. Ce dispositif expérimental a été choisi comme modèle d'induction d'un stress oxydant modéré, associé à une inflammation modérée dans les muscles (Liburt *et al.*, 2010 ; Powers *et al.*, 2011a) et dans les articulations (Reed *et al.*, 2012 ; Welsh *et al.*, 2013). Le soin aux animaux et le respect des procédures ont été approuvés par Nutraceutical Alliance Animal Care Committee, en accord avec la législation sur les animaux utilisés à fin de recherche expérimentale (Animals for Research Act, Ontario ; Canadian Council on Animal Care guidelines).

Le liquide synovial et le sang de la veine jugulaire ont été prélevés avant exercice (-24h) et à 1h et 24h après exercice. Le statut inflammatoire a été déterminé par la teneur en PGE<sub>2</sub> et NO et le statut antioxydant par l'activité SOD et le TAS (total antioxidant status). La concentration en GAG a été déterminée dans le liquide synovial et le plasma, respectivement. Les dommages subis par les membranes musculaires au cours de l'exercice ont été estimés par l'analyse dans le plasma de l'activité de plusieurs enzymes musculaires : CK (créatine kinase), AST (aspartate aminotransférase), ALP (alkaline phosphatase), GGT (gamma-glutamyl transférase) et par la concentration en CRE (créatine).

### 1.2 Analyses statistiques

Les différents paramètres dans le liquide synovial et le sang ont été analysés par un modèle mixte linéaire en mesures répétées avec le cheval comme unité expérimentale, les données pré-supplémentation en covariable et les facteurs fixes suivants : groupe (Témoin, SOD), temps (-24h, +1h, +24h) et leur interaction groupe × temps. L'effet de l'exercice sur les différents paramètres a été analysé en comparant les moyennes aux différents temps (-24h, +1h, +2h) par une analyse de variance univariée (ANOVA) sur les données pré- et post-supplémentation regroupées. Les tests post-hoc pour les comparaisons par paires entre les différents temps ont ensuite été réalisés par le test de Tukey. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel IBM SPSS Statistics 21.0 et les résultats considérés comme significatifs pour une probabilité  $P \leq 0,05$ . Les résultats présentant une tendance statistique ( $0,05 < P \leq 0,1$ ) figurent aussi dans la discussion des résultats.



## 2 Résultats

### 2.1 Effet de l'exercice

#### 2.1.1 Biomarqueurs du liquide synovial (Tableau 1)

L'exercice induit une augmentation significative de la concentration en GAG 1h après exercice (-24h vs +1h :  $P = 0,05$ ), la teneur à +24h étant intermédiaire entre les valeurs à -24h et +1h. Une augmentation de la concentration en NO est aussi observée de manière significative à +1h (-24h vs +1h :  $P = 0,02$ ) et selon une tendance à +24h (-24h vs +24h :  $P = 0,06$ ) après exercice.

#### 2.1.2 Biomarqueurs plasmatiques (Tableau 1)

L'exercice induit une dégradation des membranes musculaires, se traduisant par une augmentation significative de l'activité des enzymes CK (-24h vs +1h :  $P < 0,001$  ; -24h vs +24h :  $P = 0,001$ ), AST (-24h vs +24h :  $P = 0,004$  ; +1h vs +24h :  $P = 0,09$ ) et de la créatine (-24h vs +1h :  $P = 0,002$  ; +1h vs +24h :  $P = 0,001$ ) dans le plasma. Il est à noter qu'à 24h, l'activité CK est intermédiaire entre les valeurs à -24h et +1h, la concentration en créatine est revenue à la valeur pré-exercice (-24h) et l'activité AST continue à augmenter entre +1h et +24h ( $P < 0,10$ ).

Tableau 1 : Biomarqueurs plasmatiques et synoviaux analysés avant (-24h) et après (+1h, +24h) exercice

**Table 1: Plasma and synovial fluid biomarkers analyzed before (-24h) and after (+1h, +24h) the exercise**

		-24h	+1h	+24h	Probabilité
LIQUIDE SYNOVIAL	GAG (mg/L)	298,5 ±12,5 <sup>A</sup>	487,2 ±83,8 <sup>B</sup>	409,9 ±53,1 <sup>AB</sup>	0,06
	NO (µM)	7,8 ±0,6 <sup>Aa</sup>	22,5 ±5,2 <sup>B</sup>	20,5 ±4,4 <sup>b</sup>	0,02
PLASMA	CK (IU/L)	254,1 ±18,6 <sup>A</sup>	537,6 ±46,2 <sup>B</sup>	469,9 ±51,9 <sup>B</sup>	<0,001
	CRE (µM)	115,1 ±5,8 <sup>A</sup>	141,2 ±5,2 <sup>B</sup>	114,9 ±4,2 <sup>A</sup>	<0,001
	AST (IU/L)	354,6 ±12,6 <sup>A</sup>	384,9 ±14,2 <sup>a</sup>	443,6 ±27,7 <sup>Bb</sup>	0,005

a, b :  $0,05 < P < 0,1$  ; A, B :  $P \leq 0,05$  ; les valeurs entre parenthèses sont les erreurs standard de la moyenne

### 2.2 Effet de la supplémentation en SOD végétale

#### 2.2.1 Biomarqueurs du liquide synovial (Tableau 2)

Cet apport en antioxydant primaire induit une réduction significative de la concentration moyenne en PGE2 (T : 361,7 ng/L ; S : 237,1 ng/L ;  $P = 0,02$ ) et selon une tendance pour les concentrations moyennes en NO (T : 21,8 µM ; S : 9,8 µM ;  $P = 0,08$ ) et GAG (T : 490,3 mg/L ; S : 304,6 mg/L ;  $P = 0,1$ ). Cette supplémentation a aussi tendance à stimuler les défenses antioxydantes du liquide synovial en augmentant l'activité SOD moyenne (T : 63,5 IU/mL ; S : 77,3 IU/mL ;  $P = 0,1$ ).

Tableau 2 : Biomarqueurs du liquide synovial dans les 2 groupes (moyenne Témoin, SOD)

**Table 2: Synovial fluid biomarkers in the 2 groups (Control, SOD)**

Temps	Groupe	GAG (mg/L)	PGE2 (ng/L)	NO (µM)	TAS (mM Trolox)	SOD (IU/mL)
-24h	Témoin (T)	348,2 ±36,8	380,5 ±65,9	8,8 ±1,4	1,621 ±0,035	68,9 ±8,6
	SOD (S)	289,0 ±36,9	281,4 ±66,2	6,7 ±1,3	1,639 ±0,036	64,2 ±8,7
+1h	Témoin (T)	817,6 ±230,5	397,8 ±62,0	43,7 ±13,1	1,395 ±0,106	56,4 ±11,9
	SOD (S)	307,8 ±230,5	233,2 ±61,1	10,9 ±13,1	1,629 ±0,106	85,8 ±12,0
+24h	Témoin (T)	305,1 ±16,4	306,8 ±54,4	13,0 ±3,1	1,648 ±0,043	65,2 ±9,8
	SOD (S)	316,9 ±20,0	196,7 ±54,3	11,7 ±3,7	1,645 ±0,042	82,0 ±10,0
Probabilité		0,1 (T > S)	0,02 (T > S)	0,08 (T > S)	0,2	0,1 (T < S)

Les valeurs entre parenthèses sont les erreurs standard de la moyenne.

#### 2.2.2 Biomarqueurs plasmatiques (Tableau 3)

Cet apport en antioxydant primaire induit une réduction significative de l'activité enzymatique moyenne CK (T : 508,9 IU/L ; S : 355,4 IU/L ;  $P = 0,01$ ) et de la concentration moyenne en PGE2 (T : 332,2 ng/L ; S : 173,1



ng/L ; P = 0,01) et selon une tendance pour l'activité enzymatique moyenne GGT (T : 31,1 IU/L ; S : 24,1 IU/L ; P = 0,1).

Tableau 3 : Biomarqueurs plasmatiques dans les 2 groupes (Témoin, SOD)  
**Table 3: Plasma biomarkers in the 2 groups (Control, SOD)**

Groupe	-24h		+1h		+24h	
	CK (IU/L)	PGE2 (ng/L)	CK (IU/L)	PGE2 (ng/L)	CK (IU/L)	PGE2 (ng/L)
Témoin (T)	328,5 ±51,6	279,1 ±38,8	569,1 ±72,6	338,9 ±80,5	629,1 ±88,9	378,7 ±85,4
SOD (S)	368,5 ±47,9	180,1 ±33,3	392,9 ±68,7	185,0 ±79,7	304,9 ±94,1	154,2 ±84,2

Les valeurs entre parenthèses sont les erreurs standard de la moyenne.

### 3 Discussion et conclusion

**Le modèle d'induction d'un stress oxydant modéré a induit une augmentation de l'inflammation (NO) dans le liquide synovial, une dégradation des structures cartilagineuses (GAG) et une fragilisation des membranes musculaires (CK, CRE, AST). Ces observations confirment les résultats d'autres études, qui ont démontré une augmentation des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant dans le sang et le liquide synovial (Powers *et al.*, 2011b), ainsi qu'une augmentation de la teneur en GAG dans le plasma (Calatroni *et al.*, 2008), suivant un exercice physique répété. Par ailleurs, une production excessive d'ERO dans les muscles et les articulations contribue directement à l'inflammation de ces tissus (Powers *et al.*, 2011b).**

La SOD végétale testée confirme être un moyen de défense efficace face au stress oxydant survenant après un effort physique intense, comme déjà démontré par Notin *et al.* (2010) et Barbé *et al.* (2014). Cette étude confirme ces observations sur le maintien de l'intégrité musculaire et apporte de nouvelles informations sur la réduction de l'inflammation (PGE2, NO) et la stimulation de l'activité enzymatique SOD dans le liquide synovial, associées à un maintien de l'intégrité du cartilage (GAG), suite à une supplémentation avec cette SOD végétale. Cette étude ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la supplémentation en antioxydants primaires afin de maintenir l'intégrité musculaire et articulaire des chevaux athlètes et/ou souffrant de pathologies articulaires.

### Références

- Barbé *et al.*, 2014. Effect of antioxidant supplementation to horses on muscle integrity and resistance to training. 65th EAAP, Copenhagen (Denmark), August 25-29, 2014.
- Calatroni *et al.*, 2008. Transient increase with strenuous exercise of plasma levels of glycosaminoglycans in humans and horses. *Connect. Tissue Res.* 49: 416-425.
- Chandrasekhar *et al.*, 1987. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Analytical Biochemistry* 161: 103-108.
- Kanter *et al.*, 1988. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 57 : 60-63.
- Liburt *et al.*, 2010. Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Veterinary Journal* 38: 280-288.
- Notin *et al.*, 2010. Oral supplementation with superoxide dismutase in Standardbred trotters in training: a double-blind placebo-controlled study. *Equine Veterinary Journal* 42: 375-381.
- Pearson *et al.*, 2009. Evaluation of inflammatory responses induced via intra-articular injection of interleukin-1 in horses receiving a dietary nutraceutical and assessment of the clinical effects of long-term nutraceutical administration. *American Journal of Veterinary Research* 70: 848-861.
- Powers *et al.*, 2011a. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology* 1 : 941-969.
- Powers *et al.*, 2011b. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *FRBM* 51: 942-950.
- Reed *et al.*, 2012. Descriptive epidemiology of joint injuries in Thoroughbred racehorses in training. *Equine Veterinary Journal* 44: 13-19.
- Welsh *et al.*, 2013. Preliminary genetic analyses of important musculoskeletal conditions of Thoroughbred racehorses in Hong Kong. *Veterinary Journal* 198: 611-615.