

Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques

J. PASTRE¹ et N. PRIYMENKO^{2*}

¹Docteur Vétérinaire, 17 av Maurice Sarraut, 11310 Saissac, FRANCE

²UP d'alimentation et de botanique appliquée, ENVT, 23 chemin des capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France

*Auteur assurant la correspondance : E-mail : n.priymenko@envt.fr

RESUME

La démonstration de l'implication du stress oxydatif dans les maladies dégénératives a conduit à compléter systématiquement les aliments des carnivores domestiques avec des molécules à action anti-oxydante. Les anti-oxydants exogènes améliorent globalement la réponse immunitaire en l'orientant vers des mécanismes à médiation cellulaire. De plus, plusieurs études ont effectivement montré, d'une part, l'existence d'une relation entre un déficit des systèmes anti-oxydants et l'installation de lésions dégénératives, et, d'autre part, que l'extension des lésions cellulaires lors d'arthrose, de cardiomyopathies et de cancer, ainsi que lors de dysfonctionnement cognitif et de cataracte chez le vieux chien, pouvait être limitée par une supplémentation en anti-oxydants. Néanmoins, l'optimisation de l'efficacité d'une telle pratique nécessite la prise en compte de facteurs individuels de sensibilité aux anti-oxydants (sexe, âge, race, statut endogène en anti-oxydants...), ainsi que la connaissance de leur métabolisme (biodisponibilité, distribution, catabolisme), de leur mode d'action (actions synergiques) et de leurs propriétés oxydo-réductrices afin de limiter l'apparition d'une éventuelle toxicité à de fortes doses. Malgré l'essor des travaux de recherche dans ce domaine, les conditions d'utilisation des anti-oxydants restent mal définies.

Mots-clés : chien, chat, stress oxydatif, anti-oxydant, alimentation.

ABSTRACT

The oxidative stress is often shown to be implicated in degenerative diseases, leading to an expanded use of antioxidants as food supplement even for domestic carnivores. The exogenous antioxidants globally improve the immune response by promoting cellular cooperation. Then, several experimental studies have demonstrated that failure in antioxidant systems induced degenerative lesions and also that a dietary supplementation can limit tissue damage either during arthrosis, cardiovascular diseases and cancers, or during the syndrome of cognitive dysfunction and cataracts in old dogs.

Nevertheless, the optimisation of this practice efficiency requires to consider individual factors of sensitivity to antioxidants (sex, breed, age, endogenous status) as well as their general metabolism (bioavailability, distribution and catabolism), their mechanisms of action (occurrence of synergic actions) and their oxido-reducing activities for preventing their eventual toxicity with high dosages.

Despite the expansion of studies in this domain, the conditions of the antioxidant utilisation remain still insufficiently defined.

Keywords : dog, cat, oxidative stress, antioxidant, nutrition.

Introduction

Les anti-oxydants sont définis par HALLIWELL [12], comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité anti-oxydante : les enzymes anti-oxydantes directement synthétisées par l'organisme (superoxyde dismutases, glutathion peroxydases, catalase...) et les composés anti-oxydants d'origine exogène c'est-à-dire alimentaire (les vitamines A, C et E ; les caroténoïdes comme le lycopène et la lutéine ; la taurine ; les polyphénols ; certains minéraux et oligoéléments comme le magnésium, le zinc, le sélénium et le manganèse). Ces systèmes anti-oxydants interviennent en protégeant les cellules des dommages oxydatifs induits par les radicaux libres. Le principe de leur emploi pour prévenir l'apparition et le développement de certaines maladies dans lesquelles sont impliqués des phénomènes oxydatifs semble séduisant.

Une première approche consiste à augmenter les apports exogènes de ces molécules. Cependant, peu d'études ont été conduites chez le chien et le chat : à l'heure actuelle, leur réelle efficacité dans ces espèces reste controversée et il n'y a

aucune loi définissant le cadre de la supplémentation en anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques.

Dans une première partie, les intérêts biologiques d'une supplémentation alimentaire en anti-oxydants sur la modulation de la réponse immunitaire ainsi que dans le cadre de traitements curatifs et/ou préventifs de maladies dégénératives chez les carnivores domestiques seront présentés. Après avoir envisagé les limites à apporter aux conclusions expérimentales, les critères d'établissement d'une supplémentation en anti-oxydants seront abordés dans une seconde partie.

Intérêts thérapeutiques d'une supplémentation en anti-oxydants

EFFETS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Les effets de la supplémentation en anti-oxydants sur le système immunitaire commencent à être étudiés 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.

Une alimentation enrichie en lutéine (de plus de 5 mg/j) [19] ou en β -carotène (20 mg/j) [6, 18] augmente significativement la proportion de lymphocytes T CD⁺₄ chez les chiots [6], les jeunes adultes [19] et les animaux âgés [18] (Tableau 1). De même, chez de jeunes chats, un apport alimentaire de 10 mg/j de lutéine favorise la multiplication des lymphocytes T helpers [20]. Les effets sur la population de lymphocytes T CD⁺₈ sont plus discrets et n'ont été mis en évidence qu'avec des doses élevées de caroténoïdes sur des chiens adultes [18, 19]. Chez des beagles adultes (jeunes ou âgés), les caroténoïdes apportés dans l'alimentation pendant 6 semaines ont accru de façon dose dépendante la capacité de multiplication des cellules sanguines mononuclées et favorisé les réponses d'hypersensibilité retardé [18, 19]. En outre, une augmentation du nombre des cellules présentatrices des antigènes (exprimant les antigènes d'histocompatibilité de classe II) ont été obtenues avec de fortes doses (20 mg/j) de β -carotène [19]. En revanche, chez les chiots, les effets des β -carotènes sur les cellules mononuclées s'avèrent nettement plus faibles, voire absent [6].

Chez les jeunes chats adultes, l'administration de lutéine (1 à 10 mg/j) concourt à stimuler les phénomènes de coopération cellulaire impliquant les cellules présentatrices de l'antigène [20], alors que les β -carotènes auraient des effets opposés selon CHEW *et al.* [8]. Néanmoins, comme chez le chien, il est fort probable que l'âge des animaux étudiés, et

donc le stade de maturité du système immunitaire, influence les capacités de réponse cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montre que l'administration de caroténoïdes (β -carotène ou lutéine) favorise la mise en place des phénomènes de coopération cellulaire entre les cellules mononuclées sanguines et les lymphocytes T, essentiellement ceux de type CD⁺₄, et l'orientation de la réponse immune vers une réponse à médiation cellulaire, chez les carnivores domestiques adultes. Cependant, la production d'IL2, une cytokine impliquée dans la stimulation des lymphocytes T CD⁺₄ et des cellules mononuclées, ne semble être modifiée, lors d'une supplémentation en caroténoïdes ni chez le chien [6, 19] ni chez le chat [8, 20]. D'autres cytokines pourraient intervenir mais elles n'ont pas été explorées dans ces différentes études.

L'apport exogène en caroténoïdes entraîne un accroissement des concentrations sériques en Ig G chez les chiots [6] et les chiens adultes [19] alors que les concentrations en Ig M restent inchangées et qu'aucune augmentation de la proportion des lymphocytes B (CD⁺₂₁) n'ait été induite. Il en ressort que ces substances oxydantes stimulent indirectement les lymphocytes B mémoire mais n'agissent pas sur la réponse humorale primaire. En revanche, l'administration de lutéine à la dose la plus élevée (10 mg/j) à de jeunes chats adultes a provoqué, en plus d'une synthèse accrue d'Ig G, une prolifération des lymphocytes B, ce qui indique une action directe sur la réponse humorale [20].

Espèce	Protocoles / références	Effets sur la réponse immunitaire							
		CD4	CD8	CMS	HSR	IL2	CD21	IgG	IgM
CHIEN	[19] Lutéine : 0 ; 5 ; 10 mg/j 12 semaines 14 beagles femelles de 17-18 mois	+	+	+	+	-	-	+	-
	[6] β -carotène : 0 ; 2 ; 20 ; 50 mg/j 8 semaines 14 beagles femelles de 4 – 5 mois	+	-	-	+	-	-	+	-
	[18] β -carotène : 18 mg/j 60 jours puis 44 mg/j 60 jours P1 : 18 labradors et fox de 1 – 3 ans P2 : 18 labradors et fox > 10 ans	+(P2)	+(P2)	+	+/(P2)	ND	-	ND	ND
CHAT	[20] Lutéine : 0 ; 1 ; 5 ; 10 mg/j 12 semaines 14 femelles de 10 mois	+	-	+	+	-	+	+	-
	[8] β -carotène : 0 ; 0.4 ; 2 ; 10 mg/j 8 semaines femelles	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	[15] α -tocophérol : 250 UI/j 60 jours puis 500 UI/j 60 jours P1 : 19 chats de 2 – 4 ans P2 : 19 chats > 9 ans	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND

TABLEAU 1 : Principaux effets sur la réponse immunitaire d'une supplémentation alimentaire par des substances anti-oxydantes (lutéine, β -carotène, α -tocophérol) chez le chien et le chat.

Les effets d'autres substances anti-oxydantes telles que l' α -tocophérol sur la réponse immunitaire ont également été étudiés chez le chat. L'étude de HAYEK *et al.* [15] montre qu'une supplémentation en vitamine E favorise la multiplication et l'activation des cellules sanguines mononuclées. En capturant et en neutralisant les radicaux oxygénés produits dans les cellules utilisant un métabolisme aérobie, ces anti-oxydants participent au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules, notamment du système immunitaire. En dehors de leur rôle dans la prévention du stress oxydatif, les anti-oxydants pourraient être ainsi considérés comme des « immunonutriments ». Ils agiraient sur la libération de molécules immunomodulatrices comme les cytokines ou les prostaglandines. Cependant, il n'existe pas de preuve directe de ces activités immunomodulatrices.

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, la séparation de leur mère et de la portée, l'adoption dans une nouvelle famille, la première visite chez le vétérinaire... correspondent à des stress majeurs. Or, il est connu que les situations de stress ont des effets immunosuppresseurs. Acquérir un système immunitaire performant est donc capital pour la santé des chiots et des chatons. Beaucoup de facteurs peuvent influencer le statut immunitaire dont l'alimentation. Si la supplémentation en anti-oxydants 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. KOELSCH *et al.* [21] ont supplémenté, depuis leur naissance, 7 chatons avec un mélange d'anti-oxydants dont la composition n'est pas précisée. Par rapport au groupe témoin, les chatons supplémentés ont présenté une réponse vaccinale humorale plus forte contre l'herpès virus et celui de la panleucopénie. Par contre, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes concernant le titre en anticorps contre les calicivirus. Grâce à la supplémentation, un niveau de protection supérieur pourrait donc être obtenu face à certaines infections chez le chaton. Les résultats des expériences menées par SMITH *et al.* [32] et DEVLIN *et al.* [10] chez des chiots de races variées vont dans le même sens : les titres en anticorps contre la parvovirose, la maladie de Carré et l'hépatite de Rubarth ont été plus élevés chez les animaux supplémentés avec un cocktail d'anti-oxydants que chez les chiots non supplémentés.

HEATON *et al.* [16] ont étudié un groupe de 20 chiens adultes de races variées supplémenté pendant 16 semaines avec un mélange de vitamines C et E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène. Ces animaux ont produit plus d'anticorps neutralisants spécifiques contre la rage 2, 4 et 6 semaines après leur vaccination. De plus, ces chiens ont atteint plus rapidement un titre protecteur en anticorps par rapport aux chiens non supplémentés. Chez les chats adultes supplémentés, les travaux de HARPER *et al.* [14] ont montré qu'il existait une production d'anticorps anti-calicivirus plus rapide et plus intense 14 jours après la vaccination annuelle.

CAS DU SYNDROME DE DYSFONCTIONNEMENT COGNITIF

En vieillissant, le chien peut développer des troubles du comportement comme de la désorientation, une diminution des interactions sociales, de la malpropreté, des troubles du sommeil et une baisse d'activité. Ces symptômes, longtemps associés à la sénilité, sont maintenant regroupés sous le nom de syndrome de dysfonctionnement cognitif (SDC). Cette pathologie canine est à rapprocher de la maladie d'Alzheimer chez l'homme.

Les changements du comportement pourraient être attribués à l'action des radicaux libres (RL) sur les neurones. Comme les neurones travaillent en aérobiose, la production de radicaux oxygénés liée en particulier à la phosphorylation oxydative couplée à la respiration cellulaire est intense, ce qui induit une sensibilité accrue des neurones au stress oxydatif. En outre, l'activité catabolique ainsi que la capacité de réparation de l'ADN sont relativement réduites dans ces cellules, diminuent avec l'âge et sont à l'origine d'une accumulation de lipides, de protéines et de lésions oxydatives de l'ADN provoquant à terme la mort de la cellule. L'établissement des lésions cellulaires et tissulaires devient irréversible en raison de l'absence de régénération des neurones et conduit au vieillissement et à l'apparition de maladies neuro-dégénératives. De plus, certaines protéines neuronales en cours de maturation sont particulièrement sensibles à l'oxydation et leur dégradation génère des fragments amyloïdes très résistants dont l'accumulation progressive induit la formation de plaques caractéristiques du SDC et de la maladie d'Alzheimer qui étouffent les neurones et les cellules gliales et qui contribuent ainsi à l'extension des lésions dégénératives.

Pour étudier les effets de la supplémentation en anti-oxydants sur le déficit cognitif lié à l'âge, MILGRAM *et al.* [23, 24] ont étudié les performances obtenues lors des tests neuropsychologiques (Tableau 2). Les performances des chiens âgés ont été améliorées en un mois environ après le début de la supplémentation, et de manière croissante avec la complexité du test. Par contre, l'enrichissement en anti-oxydants n'a eu aucun effet sur les performances des jeunes chiens. Ces résultats sont donc en faveur du développement de la supplémentation dans le traitement des troubles cognitifs de l'animal âgé mais il convient de s'interroger sur l'utilité d'une supplémentation, en prévention et à long terme, sur les jeunes animaux.

CAS DES CATARACTES

Les cellules épithéliales du cristallin sont particulièrement riches en enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPx)) et l'humeur aqueuse contient des teneurs élevées en anti-oxydants sous forme d'ascorbate, d' α -tocophérol, de carotènes et de glutathion. Ces systèmes assurent normalement la neutralisation des radicaux libres produits en continu sous l'action des rayons lumineux. Cependant, avec l'âge, ces systèmes deviennent moins actifs, aussi les radicaux libres

Protocoles / références	Résultats des tests cognitifs
[23] mélange d'anti-oxydants : 1550 ppm α -tocophérol, 1095 ppm taurine, 100 ppm ascorbate 14 jours 14 beagles de 8 – 12.5 ans 14 beagles de 2 - 4.5 ans	Discrimination d'indices : amélioration des performances chez les chiens âgés supplémentés
[24] mélange d'anti-oxydants : 1050 ppm α -tocophérol, 260 ppm L carnitine, 128 ppm acide α lipoïque, 80 ppm ascorbate 4 à 6 mois 24 beagles de 8.5 – 12.5 ans 17 beagles de 1.95 – 4.9 ans	Apprentissage de reconnaissance d'objets : amélioration des performances chez les chiens âgés supplémentés

TABLEAU 2 : Intérêt de la supplémentation en anti-oxydants dans le cadre du syndrome de dysfonctionnement cognitif (SDC) du chien âgé.

peuvent s'accumuler et oxyder les protéines et les lipides du cristallin pouvant ensuite mener à une opacification du cristallin. BARROS *et al.* [1] ont mis en évidence une diminution des concentrations plasmatiques de la vitamine C et une augmentation des concentrations de malonedialdéhyde (MAD), un marqueur du stress oxydatif, chez des cockers atteints de cataracte.

En outre, il existe un lien entre un déficit alimentaire en vitamine E et l'apparition de lésions au niveau des photorécepteurs, chez le chien [9]. La diminution de la concentration plasmatique en vitamine E, liée à un défaut chronique d'apport alimentaire, expliquerait une altération des mécanismes de réparation, des lésions accrues sur les membranes cellulaires et une accumulation de produits oxydés comme la lipofuscine dans l'œil [9].

Ainsi une déficience des systèmes anti-oxydants conduit à un stress oxydatif local et à l'installation ultérieure d'une pathologie oculaire. Néanmoins, les effets préventifs ou partiellement curatifs d'une supplémentation alimentaire en anti-oxydants lors de cataracte n'ont jamais encore été explorés.

CAS DE L'ARTHROSE

Dix-huit chiens, âgés de 1 à 13 ans, présentant de l'arthrose secondaire à une dysplasie de la hanche, ont été étudiés par IMPELLIZERI *et al.* [17]. 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. Les résultats de cette expérience montrent que les animaux sous traitement ont présenté moins de signes algiques comparés à ceux du groupe placebo. Il est néanmoins regrettable que des mesures plus objectives de l'état des articulations n'aient pas été mises en œuvre dans cette étude.

Selon FERNANDES *et al.* [11], les anti-oxydants s'opposent directement à la résorption osseuse, en réduisant la formation des radicaux oxygénés par les ostéoclastes. En outre, cet effet est renforcé par l'inhibition de la production de messagers de l'inflammation, tels que la PGE₂. En inhi-

bant la libération de cette prostaglandine capable de stimuler les ostéoclastes, la vitamine E ralentit la résorption osseuse et privilégie l'ostéosynthèse [11].

CAS DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Le chien étant un modèle animal pour l'étude des troubles cardiaques chez l'homme, de nombreuses données concernant les mécanismes du stress oxydatif au niveau du cœur, sont disponibles dans cette espèce.

Expérimentalement, le rôle du stress oxydatif dans l'évolution des maladies cardio-vasculaires a été prouvé : les travaux de CESSALI *et al.* [5] ont montré, qu'après induction d'une congestion cardiaque expérimentale, on observait une augmentation des fragments p53 (la protéine p53 se fragmente lorsqu'il y a formation de lésions oxydatives sur l'ADN) et une augmentation de cellules cardiaques contenant de la nitrotyrosine (la nitroglycosylation des protéines étant une conséquence de l'accumulation de radicaux libres). L'altération de la fonction mitochondriale et les modifications de la distribution intracellulaire du calcium engendrent une production massive de radicaux oxygénés, dont le peroxy-nitrite ONOO⁻, qui provoquent des lésions oxydatives des macromolécules (protéines, lipides, ADN) et, à terme, la mort des myocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes, à l'origine de la détérioration de la fonction cardiaque [33]. La mort des myocytes cause une diminution de la contractilité cardiaque, la mort de cellules endothéliales entraîne des lésions au niveau des capillaires sanguins et une mauvaise oxygénation du tissu cardiaque. Enfin, la diminution du nombre des fibroblastes est à l'origine d'une diminution de la cohésion des différentes cellules et facilite la dilation du cœur. Le stress oxydatif intervient donc dans la genèse de troubles cardiaques.

Aussi, malgré l'absence de preuve directe de l'efficacité des anti-oxydants dans la prévention et l'amélioration des maladies cardiovasculaires, il existe quelques arguments en faveur de leur utilisation. Selon CARNES *et al.* [3], la supplémentation de 11 Beagles avec des doses de 500 mg de vitamine C 2 fois par jour pendant 5 jours, atténue les effets du remodelage électrophysiologique du cœur soumis à un stress. PION *et al.* [29] ont mis en évidence une amélioration clinique importante de 33 chats souffrants de myocardiopa-

thie dilatée grâce à une supplémentation orale avec 0,5 g de taurine pendant 4 semaines. Cependant, il convient de rester prudent sur l'utilisation des anti-oxydants en prévention des troubles cardiaques comme le montrent les travaux de SEBBAG *et al.* [31] : quarante Beagles adultes ont été supplémentés pendant deux mois avec 500 mg d' α -tocophérol par jour. A l'issue de cette période, 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, aussi la supplémentation a eu un effet soit bénéfique soit délétère en fonction du paramètre considéré.

CAS DES CANCERS

Chez l'homme, plusieurs études épidémiologiques montrent une corrélation entre une alimentation enrichie en anti-oxydants et une diminution de l'incidence des cancers. Cette constatation a conduit les chercheurs à s'interroger sur l'intérêt d'une telle supplémentation, chez le chien et le chat.

HEATON *et al.* [16] ont étudié le rôle des anti-oxydants dans la prévention des lésions de l'ADN sur 40 chiens. Vingt d'entre eux ont été soumis à un programme de supplémentation de 16 semaines avec un mélange de vitamines C et E, de taurine, de lutéine, de lycopène et de β -carotène (la composition précise n'est pas connue). Après 8 semaines de supplémentation, le nombre de lésions de l'ADN, mesurées par la méthode des Comètes, a été significativement diminué. WATERS *et al.* [34] ont étudié les effets de la supplémentation en sélénium sur l'apparition de lésions de l'ADN et de l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques, chez le chien. Quarante-neuf Beagles mâles non castrés, ne présentant initialement aucune image histologique maligne de la prostate, ont été utilisés. Le groupe témoin ($n = 10$) recevait un régime de base contenant 0,3 ppm de sélénium. Le groupe supplémenté recevait ce même régime complété avec 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ ou 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de sélénium pendant 7 mois. Chez les animaux supplémentés, le pourcentage de cellules prostatiques présentant des lésions de l'ADN a diminué et le nombre de cellules épithéliales prostatiques apoptotiques a augmenté. Néanmoins, cette supplémentation n'a pas induit d'augmentation de l'activité plasmatique de la GPx alors que cette enzyme est sélénodépendante, ce qui suggère que les effets anti-cancérogènes du sélénium semblent indépendants de l'activité de cette enzyme. Cependant, ce résultat est à prendre avec précaution puisque l'activité tissulaire de cette enzyme n'a pas été mesurée. Le sélénium favoriserait l'induction de l'apoptose des cellules incapables de réparer leur ADN lésé par des mécanismes encore mal connus et préviendrait ainsi leur transformation en cellules malignes.

Outre l'implication des anti-oxydants dans la préservation de l'information génétique, ils agissent indirectement dans la lutte contre le cancer en privilégiant une réponse immunitaire

à médiation cellulaire. Cependant, plusieurs types cellulaires (lymphocytes T cytotoxiques, cellules K et NK) produisent des radicaux oxygénés pour détruire les bactéries et les cellules transformées chimiquement ou par des microorganismes ou par des parasites. De même, le mode d'action de plusieurs agents anti-cancéreux (Adriamycine, Doxorubicine...) est de privilégier la production de radicaux oxygénés, aussi leur utilisation conjointe avec des agents d'anti-oxydants pourrait s'avérer délétère, d'une part en diminuant le potentiel cytotoxique de l'organisme ou de la chimiothérapie et, d'autre part en favorisant l'émergence de mécanismes de résistance des cellules cancéreuses. Les études épidémiologiques conduites chez l'homme sur l'utilisation des α -tocophérols et des β -carotènes en sont des exemples pertinents : de fortes doses de β -carotène (20 mg par jour) sont corrélées à une fréquence augmentée de cancers pulmonaires, chez le fumeur. L'étude de RUSSEL *et al.* [30], 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 dérivés oxydés potentiellement capables d'initier des réactions oxydatives. Ainsi, des métabolites du β -carotène comme les β -apo-14'-, β -apo-12'-, β -apo-10'- et β -apo-8'-caroténal, isolés en quantité trois fois plus importantes dans des extraits de poumons de furets exposés à la fumée de cigarette par rapport à ceux de furets non exposés, pourraient être des agents oxydatifs. Ces métabolites auraient une action inductrice sur les cytochromes P450, entraînant une augmentation de la concentration en acide rétinoïque, responsable de la multiplication des cellules épithéliales et de 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, associées à une exposition à la fumée de cigarette, étaient néfastes chez l'homme [26]. De plus, les furets supplémentés, avec une dose de β -carotène correspondant à 30 mg/j chez l'homme, ont présenté des lésions de prolifération locale de cellules alvéolaires et de macrophages, même sans exposition à la fumée de cigarette. Par contre, l'utilisation de β -carotène à dose physiologique n'entraîne pas de tels effets. De plus, les lésions précancéreuses causées par les fortes doses de β -carotène et l'exposition à la cigarette, pourraient être prévenues par l'emploi concomitant de vitamines C et E, connues pour leur action inhibitrice sur les cytochromes P450, selon NAVASUMRIT *et al.* [25]. Ces études montrent l'importance d'établir des doses en caroténoïdes adaptées à l'espèce cible afin de mettre en place une prévention réelle des risques cancéreux.

Les différentes études de supplémentation avec des substances anti-oxydantes chez les carnivores domestiques démontrent un intérêt potentiel de ces composés dans le contrôle du système immunitaire (orientation vers une réponse à médiation cellulaire) et dans la prévention de maladies dégénératives (arthrose, cataracte, cardiopathies, SDC, cancers...), ce qui conduit à élargir leur utilisation en alimentation animale. Néanmoins, la diversité des composés anti-

oxydants utilisés seuls ou en combinaison et l'hétérogénéité des protocoles mis en œuvre (paramètres mesurés, caractéristiques des populations animales, posologie et durée d'administration) rendent difficile une interprétation non équivoque des résultats donc leur extrapolation à l'ensemble de la population canine ou féline, puis soulignent la nécessité de définir des méthodes standardisées de supplémentation.

Critères d'établissement d'une supplémentation alimentaire rationnelle

Plusieurs facteurs sont à prendre en considération dans l'évaluation du bénéfice d'une supplémentation alimentaire en anti-oxydants. Après avoir précisé l'unité de mesure des effets recherchés (quantification des lésions oxydatives, mise en évidence d'un stress oxydatif ou de l'aptitude à résister au stress oxydatif, amélioration d'une thérapie ou d'une maladie) afin de disposer d'une métrique standardisée, il convient d'identifier les facteurs de réceptivité à la supplémentation ainsi que de définir le ou les composés et leurs posologies (dose, rythme d'administration) les plus adaptés.

FACTEURS DE RÉCEPTIVITÉ

Les facteurs biologiques inhérents à l'animal (race, âge, sexe...) peuvent fortement influencer les effets de la supplémentation mise en place.

L'étude de HARPER *et al.* [13] a montré que l'activité plasmatique de la SOD et la capacité anti-oxydante plasmatique totale dépendaient, chez le chien, de la race. En particulier, les Beagles présentent une activité anti-oxydante plasmatique inférieure à celle des Labradors et des Yorkshire terriers. Cette hétérogénéité pourrait signer une efficacité différentielle des systèmes anti-oxydants et donc se traduire par des besoins différents selon la race considérée.

L'âge des animaux peut également influencer les effets observés : KEARNS *et al.* [18] ont ainsi montré que l'ajout de β -carotènes dans l'alimentation entraînait une stimulation de la lymphoblastogenèse chez des Labradors et des Fox terriers adultes ou âgés, à l'inverse des résultats obtenus par CHEW *et al.* [6] chez des chiots âgés de 4 à 5 mois.

Le statut individuel initial en anti-oxydant (cas de dénutrition, carence sub-clinique) difficile à apprécier, pourrait aussi contribuer à l'hétérogénéité des résultats observés. Enfin, la capacité individuelle d'absorption des anti-oxydants pourrait faire varier l'efficacité de la supplémentation. Par exemple, certains chiens, appelés « faibles répondeurs », ne pourraient assimiler en fait que de très faibles quantités journalières de β -carotènes. A l'issue de 8 semaines de supplémentation, les concentrations plasmatiques de provitamine A sont restées inchangées dans environ 15 % de l'effectif canin considéré [6]. Ces variations individuelles de l'assimilation des nutriments anti-oxydants existent également chez l'homme [35] et chez le chat [7].

CHOIX DE L'ANTI-OXYDANT ET DOSES UTILISABLES

Une supplémentation en anti-oxydants ne peut se révéler efficace que dans la mesure où ceux-ci ne sont pas ou peu dégradés lors des techniques de fabrication de l'aliment et dans le tube digestif et qu'ils sont efficacement absorbés. La fréquence de l'apport doit aussi correspondre aux caractéristiques pharmacocinétiques de chaque molécule utilisée.

Fragilité des anti-oxydants dans l'alimentation

Un des problèmes rencontrés lors de la supplémentation alimentaire en anti-oxydants est le manque de stabilité de ces composés et, en particulier, leur sensibilité à l'oxydation durant les procédés de fabrication et de stockage. Les anti-oxydants sont généralement sensibles à la chaleur, à l'action de l'oxygène, à la lumière et à l'action des métaux. Les fabricants testent différentes formes de molécules et utilisent certains conditionnements pour les protéger. Par exemple, l'emploi de conditionnements opaques, imperméables à l'oxygène, permet de prévenir les oxydations. Enfin, le moment de l'ajout des anti-oxydants à la formule est important pour éviter leur dénaturation au cours des processus de fabrication de l'aliment, c'est pourquoi ils sont souvent ajoutés en fin de fabrication, en enrobage avec les autres minéraux et vitamines. Ces pertes durant les procédés et le stockage doivent être prises en compte lors de la réalisation de la supplémentation.

Biodisponibilité et interactions des anti-oxydants

La biodisponibilité des anti-oxydants, en particulier des carotènes [6], dépend de l'individu mais aussi de l'existence de phénomènes de compétition lors de l'absorption intestinale avec des composés structurellement voisins (compétitions entre les caroténoïdes, les caroténoïdes et la vitamine A...) [35].

En outre, l'assimilation d'un composé exogène peut être limitée par l'existence de voies de biosynthèses endogènes, comme c'est le cas pour la vitamine C qui peut être produite à partir du glucose dans le foie des carnivores domestiques [28]. De plus, le catabolisme et l'excrétion rapide des métabolites de l'ascorbate provoquent une disparition rapide de la vitamine C dans le compartiment sanguin et réduisent les effets de la supplémentation [28] (Figure 1). Ces résultats sont en accord avec les travaux de MARSHALL *et al.* [22] qui n'ont obtenu qu'une augmentation transitoire (de 24 heures) de la concentration plasmatique d'ascorbate lors d'une supplémentation à la dose de 1 g/j, chez des greyhounds.

Les anti-oxydants interviennent de façon synergique dans la lutte contre le stress oxydatif et en particulier dans le contrôle des mécanismes de peroxydation lipidique (Figure 2). Les composés lipophiles comme la vitamine E (essentiellement l' α -tocophérol) et, à un moindre degré, les caroténoïdes piègent les radicaux peroxydes libres à l'échelle membranaire et les réduisent en hydroperoxydes, ce qui limite la phase de propagation des réactions radicalaires. Pour que cette action se prolonge dans le temps, les formes

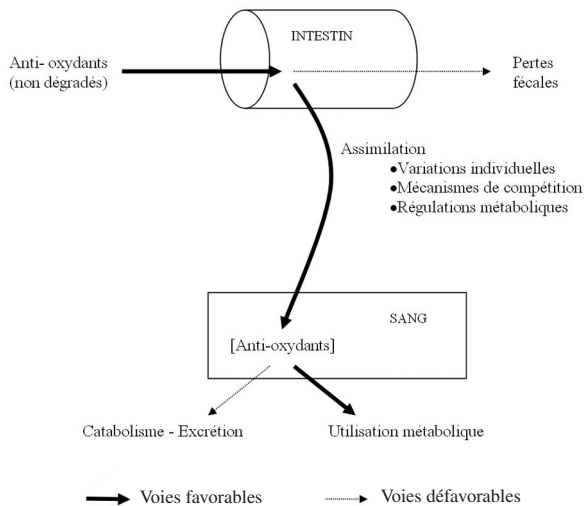


Figure 1 : Critères métaboliques d'efficacité d'une supplémentation alimentaire en anti-oxydants.

oxydées des caroténoïdes et du radical tocophérol doivent ensuite subir une réduction non enzymatique assurée par l'ascorbate, dans le cytosol. Une enzyme, la thiol transférase, utilise le glutathion comme agent réducteur pour régénérer la vitamine C, mais cette réaction conduit à l'accumulation de glutathion oxydé. De plus, les hydroperoxydes sont rapidement réduits en alcools grâce à l'action des glutathion peroxydases. Ces enzymes sélénodépendantes utilisent également le glutathion comme réducteur. L'action synergique de ces systèmes anti-oxydants ne peut donc être pérenne que dans la mesure où la forme réduite du glutathion reste majoritaire. La glutathion réductase flavodépendante assure la réduction du glutathion oxydé en utilisant NADPH comme donneur d'électrons. L'existence de ces interactions entre anti-oxydants expliquerait l'intérêt de leur utilisation combinée dans le cadre d'une supplémentation. Un anti-oxydant utilisé seul ne peut exprimer une quelconque efficacité que si les autres systèmes sont déjà en quantité suffisante sinon le composé dont la concentration est la plus faible devient le facteur limitant et les effets potentiels seront limités en intensité et/ou dans le temps.

Cependant, la saturation plasmatique ne correspond pas obligatoirement à la dose permettant une efficacité optimale de la supplémentation. Après avoir été absorbés, les nutriments sont distribués dans tout l'organisme. Pour parvenir à renforcer les défenses de l'organisme, il est nécessaire qu'ils se concentrent dans les tissus et les cellules utilisant un métabolisme aérobie et/ou oxydatif. La connaissance de la pharmacocinétique des anti-oxydants et l'étude de leur distribution tissulaire et cellulaire sont pour cela indispensables.

SCHÉMA POSOLOGIQUE

L'établissement d'un schéma posologique pour l'établissement d'une supplémentation en anti-oxydant(s) doit tenir compte non seulement des actions ambivalentes des radicaux libres mais aussi d'une éventuelle toxicité de ces composés exogènes.

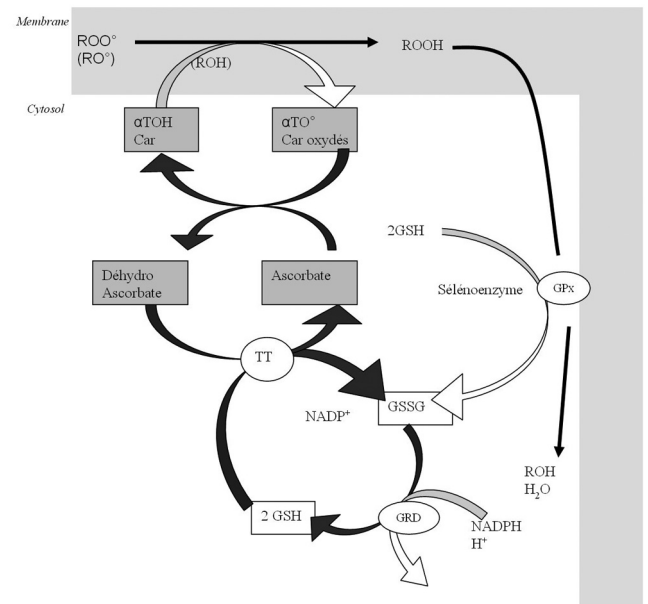


Figure 2 : Synergie des systèmes anti-oxydants dans le cas d'une peroxydation lipidique.

α -TOH : α -tocophérol ; Car : caroténoïdes ; TT : Thiol Transférase ; GPx : Glutathion peroxydase ; GRD : Glutathion réductase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé.

Ambivalence des radicaux oxygénés

Les radicaux oxygénés sont normalement produits au cours du métabolisme aérobie oxydatif (Tableau 3). Par exemple, lors de la phosphorylation oxydative mitochondriale, les transferts électroniques des chaînes d'oxydoréduction permettent de libérer l'énergie indispensable à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi) mais conduisent en parallèle à la réduction de O_2 en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), considéré comme un oxydant majeur, puis en H_2O . De même, le fonctionnement des cytochromes P450 au cours des réactions de mono ou de dioxygénation est lié à la réduction de O_2 en anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et peroxy (O_2^{2-}) ou en radical hydroxyle (HO^{\cdot}). Les radicaux oxygénés interviennent également dans les réactions de défense de l'organisme, en particulier dans la bactéricidie. A l'issue de la phagocytose réalisée par les macrophages et les neutrophiles, les phagosomes contenant les bactéries fusionnent avec les lysosomes qui fournissent l'équipement enzymatique nécessaire à la dégradation bactérienne. Outre de nombreuses hydrolases, ces organites sont riches en enzymes (superoxyde dismutases, NADPH oxydase, myéloperoxydase..) qui catalysent la production de radicaux oxygénés (Tableau 3). La formation de phago-lysosome entraîne une succession de réactions appelée « l'explosion respiratoire » qui génère des oxydants doués d'activité bactéricide (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$, HO^{\cdot} , ONO_2^{\cdot}).

Il a également été montré que certains radicaux oxygénés jouent le rôle de messagers chimiques. C'est, par exemple, le cas de l'oxyde nitreux NO^{\cdot} qui est un agent vasodilatateur majeur et qui intervient aussi comme neuromédiateur dans les phénomènes de mémorisation à long terme.

Enfin, les radicaux libres participent à la régulation de l'expression de différents gènes, par exemple le gène codant pour p53, ce qui leur confère un rôle important dans les

Oxydants	Voies endogènes de production
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Phosphorylation oxydative Fonctionnement des cytochromes P450 NADPH oxydase : $O_2 \xrightarrow{NADPH} O_2^{\cdot -} + NADP^+$
H_2O_2	Dismutation de $O_2^{\cdot -}$ spontanée ou avec SOD $2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$
OH^{\cdot}	Réaction de Fenton : $H_2O_2 + H^{\cdot} \xrightarrow{Fe^{3+}} H_2O + OH^{\cdot}$ Réaction de Haber-Weiss : $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \xrightarrow{Fe^{2+} / Cu^{2+}} O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$ Radiolyse de l'eau : $H_2O \longrightarrow OH^{\cdot} + H^{\cdot}$
Oxyde nitreux (NO^{\cdot}) et peroxydinitrite ($ONO_2^{\cdot -}$)	Arginine \xrightarrow{NOS} NO^{\cdot} + Citrulline $NO^{\cdot} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow ONO_2^{\cdot -}$
Oxyde chloreux (ClO^{\cdot})	$H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MLP} H_2O + ClO^{\cdot}$

SOD : superoxyde dismutase ; NOS : NO synthase ; MLP : myéloperoxydase.

TABLEAU 3 : Principales voies de production des radicaux oxygénés.

phénomènes de croissance et de mort cellulaire programmée (apoptose) et éventuellement dans les phénomènes de cancérogénèse [4].

Les radicaux oxygénés sont donc des composés physiologiquement obtenus durant le métabolisme cellulaire aérobie, qui exercent des actions biologiques. Normalement, les quantités produites restent faibles en raison de la rapidité de leur utilisation et de leur dégradation par les systèmes anti-oxydants. Ce n'est que lors d'une accumulation due à une défaillance de ces derniers ou à une production massive et soudaine (radiolyse de l'eau, excès de métaux de transition tels que le fer) que les radicaux oxygénés deviennent délétères et qu'une neutralisation par des composés exogènes devient utile.

Toxicité des anti-oxydants

Les anti-oxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophéryl (α -TO $^{\cdot}$) stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono-

et poly-insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle pro oxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération.

Durée d'administration

La tendance actuelle est d'enrichir quotidiennement l'alimentation des carnivores domestiques en anti-oxydants. Pourtant, à certaines périodes de leur vie, les chiens et chats peuvent avoir à faire face à un stress oxydatif accru (sevrage, exercice physique intense, vieillesse...). La question est donc de savoir s'il est plus intéressant d'augmenter les apports en anti-oxydants des animaux tout au long de leur vie ou de les supplémenter à court terme dans certaines situations.

La supplémentation ponctuelle pourrait être intéressante, par exemple, chez des animaux qui vont subir une intervention chirurgicale. D'après O'REILLY *et al.* [27], une simple

sédation à la médétomidine a été à l'origine d'une diminution des défenses anti-oxydantes (diminution de la concentration plasmatique moyenne en α -tocophérol 1 h après l'induction de l'anesthésie). BUI *et al.* [2] ont démontré qu'il était possible, grâce à une supplémentation pendant 4 semaines avec 62.2 UI de vitamine E et 3.3 mg de vitamine C pour 400 kcal, de prévenir le stress oxydatif induit par une anesthésie générale chez le chien.

Cependant, la prise alimentaire ponctuelle d'anti-oxydants n'a pas de sens à court terme car, dès l'arrêt de toute supplémentation, les concentrations plasmatiques 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 des concentrations plasmatiques importantes n'étant pas immédiate dès le début de la supplémentation [6]. Enfin, d'après MILGRAM *et al.* [23], les effets positifs des anti-oxydants après une courte période de supplémentation (14 jours) ont été moins importants qu'après une période de 6 mois. Il est aussi intéressant de noter que la dose la plus forte ne permet pas toujours d'obtenir les meilleurs effets. D'après HAYEK *et al.* [15], les réponses immunologiques optimales à la supplémentation en vitamine E d'un groupe de chats âgés (moyenne d'âge de 9,92 ans) ont été différentes en fonction des quantités employées : la production de PGE2 a été diminuée avec 500 UI de vitamine E/kg d'aliment mais la meilleure réponse à une stimulation antigénique avec de la phytohémagglutinine A (PHA) a été atteinte avec une dose de 250 UI.

Conclusion

Malgré l'engouement actuel pour la supplémentation en anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, les arguments directs de leur efficacité sont relativement faibles en raison de l'utilisation d'échantillons de population de petite taille, de l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux mis en place et de l'ambivalence des effets biologiques des radicaux oxygénés. En effet, les radicaux oxygénés produits physiologiquement durant le métabolisme aérobie oxydatif, interviennent dans les systèmes de défenses de l'organisme (bactéricidie, actions cytotoxiques sur des cellules devenues anormales) et jouent le rôle de messagers chimiques. Seule leur accumulation liée à une production excessive ou à une défaillance des capacités anti-oxydantes endogènes (stress oxydatif) devient préjudiciable car elle entraîne des lésions oxydatives des macromolécules (protéines, ADN, lipides membranaires) et la mort cellulaire.

Néanmoins, de nombreux travaux prouvent l'implication du stress oxydatif dans la pathogénie de maladies à caractère essentiellement dégénératif. Il est donc logique de penser que la restauration ou le renforcement des systèmes anti-oxydants peut contribuer à freiner le développement de telles lésions. Le bénéfice d'une supplémentation alimentaire en anti-oxydants a été démontré chez les carnivores domestiques lors de syndrome de dysfonctionnement cognitif, d'arthrose, de cardiopathies et de cancers (exemple du cancer de la prostate). Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'études

portant sur les effets préventifs à long terme d'un apport alimentaire enrichi en anti-oxydants sur l'apparition de ces maladies dégénératives. De plus, les actions synergiques des anti-oxydants dans la lutte contre le stress oxydatif rendent difficile la mise en place d'études expérimentales visant à démontrer l'efficacité d'un composé en particulier : un des systèmes anti-oxydants endogènes peut dans ce cas devenir le facteur limitant et limiter l'efficacité biologique recherchée. Enfin, certains anti-oxydants tels que les caroténoïdes (β -carotènes) et l' α -tocophérol sont des oxydants potentiels et leur utilisation à forte dose conduit à l'expression de leur toxicité, c'est-à-dire à la mise en place d'un stress oxydatif.

En conséquence, la mise en place de façon systématique d'une supplémentation en anti-oxydants chez les carnivores domestiques n'est pas justifiée actuellement, et leur utilisation plus ponctuelle (sur une population à risque) devrait tenir compte des facteurs de sensibilité intrinsèque des animaux ainsi que des caractéristiques métaboliques (pharmacocinétique, catabolisme, mode d'action...) de l'ensemble des anti-oxydants, endogènes et exogènes.

Références

- 1.- BARROS P., ANGELOTTI A., NOBRE F., MORALES A., FANTONI D., BARROS S.: Antioxidant profile of cataractous English Cocker Spaniels. *Vet. Ophthalmol.*, 1999, 2, 83-86.
- 2.- BUILM., 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.
- 3.- CARNES CA., CHUNG MK., NAKAYAMA T., NAKAYAMA H., BALIG RS., PIAO S., KANDERIAN A., PAVIA S., HAMLIN R., MCCARTHY P., BAUER J., VAN WAGONER D.: Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation an electrical remodelling and decreases the incidence of postoperative atrial fibrillation. *Circ. Res.*, 2001, 89, e32.
- 4.- CATALANO A., RODOLOSSI S., CAPRARI P., COPPOLA V., PROCOPIO A.: 5-lipoxygenase regulates senescence-like growth arrest by promoting ROS-dependent p53 activation. *EMBO J.*, 2005, 4, 170-179.
- 5.- CESSALI D., JAKONIUK I., BARLUCCHI L., BELTRAMI AP., HINTZE TH., NADAL-GINARD 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.
- 6.- 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.*, 2000, 130, 1910-1913.
- 7.- CHEW BP., SOON PARK J., WENG BC., WONG TS., HAYEK MG., REINHART GA.: Dietary β -carotene absorption by blood plasma and leucocytes in domestic cats. *J. Nutr.*, 2000, 130, 2322-2325.
- 8.- 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.
- 9.- DAVIDSON MG., GEOLY FJ., GILGER BC., Mc LELLAN GJ., WHITLEY W.: Retinal degeneration associated with vitamin E deficiency in hunting dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, 213, 645-651.
- 10.- 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. Intern. Med.*, 2000, 14, 361.
- 11.- FERNANDES G., LAWRENCE R., SUN D.: Protective effect of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2003, 68, 361-372.
- 12.- HALLIWELL B.: How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comm.*, 1999, 9, 1-32.

- 13.– HARPER EJ., CHARLTON CJ., SKINNER ND.: Total plasma antioxidant and superoxide dismutase status in dogs: are normal ranges influenced by breed? *FASEB J.*, 1999, 13 (A565), 446-457.
- 14.– HARPER EJ., DEVLIN P., HEATON P., KOELSCH S.: Feline immunocompetence and the role of antioxidants. North American Veterinary Conference Proceedings, 2001, 249-251.
- 15.– 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.
- 16.– 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.*, 2002, 132, 1720S-1724S.
- 17.– 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, S107-S108.
- 18.– 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.
- 19.– 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.
- 20.– 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.
- 21.– KOELSCH S., SMITH BHE.: Strengthening the barriers against feline infectious diseases: the benefits of antioxidants. *Waltham focus*, 2001, 11, 2.
- 22.– MARSHALL RJ., SCOTT KC., HILL RC., LEWIS DD., SUNDS-TROMD., JONES GL., HARPER J.: Supplemental vitamin C appears to slow racing Greyhounds. *J. Nutr.*, 2002, 132, 1616S-1621S.
- 23.– 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.*, 2002, 26, 679-695.
- 24.– 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*, 2002, 23, 737-745.
- 25.– NAVASUMRIT P., WARD TH., DODD NJF., O'CONNOR J.: Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*, 2000, 21, 93-99.
- 26.– OMENN GS., GOODMAN GE., THORNQUIST MD., BALMES J., CULLEN MR., GLASS A., KEOGH JP., MEYKENS FL., VALANIS B., WILLIAMS JH., BARNHART S., HAMMAR S.: Effect of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 334, 1150-1155.
- 27.– O'REILLY J., CHARLTON CJ., SMITH BHE., HARPER EJ.: Mild sedation causes oxidative stress in domestic dogs. *FASEB J.*, 2000, 14 (A200), 144.13.
- 28.– 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.
- 29.– 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.
- 30.– RUSSEL RM., MAYER J.: The enigma of β -Carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. *J. Nutr.*, 2004, 134, 262S-268S.
- 31.– 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.
- 32.– SMITH BHE., DEVLIN P.: Enhancing puppy immune response through diet. *Waltham focus*, 2000, 10, 32-33.
- 33.– UNGVARI Z., GUPTA SA, RECCHU AF., BATKAI S., PACHER P.: Role of oxidative-nitrosamine stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2005, 3, 221-229.
- 34.– 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.
- 35.– YEUM K-J., RUSSEL R.: Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Ann. Rev. Nutr.*, 2002, 22, 483-504.