

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

2016

Impact d'un extrait standardisé d'une algue rouge *Porphyra umbilicalis* PORPHYRAL HSP ND sur Hsp72, IL-6 et TNF- α

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 15 décembre 2016
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Violaine Géraldine Marie PINEAU

Née le 30 novembre 1989 à Roubaix (59)

JURY

Président : Monsieur Yves MAUGARS,
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Madame Anne COUROUCE MALBLANC,
Professeur à ONIRIS (Rapporteur)

Madame Julie HERVE,
Maître de conférences à ONIRIS (Assesseur)

Invité : Monsieur Claude FAIVRE,
Responsable Scientifique et Développement au laboratoire WAMINE



ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

2016

Impact d'un extrait standardisé d'une algue rouge *Porphyra umbilicalis* PORPHYRAL HSP ND sur Hsp72, IL-6 et TNF- α

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 15 décembre 2016
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Violaine Géraldine Marie PINEAU

Née le 30 novembre 1989 à Roubaix (59)

JURY

Président : Monsieur Yves MAUGARS,
Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres : Madame Anne COUROUCE MALBLANC,
Professeur à ONIRIS (Rapporteur)

Madame Julie HERVE,
Maître de conférences à ONIRIS (Assesseur)

Invité : Monsieur Claude FAIVRE,
Responsable Scientifique et Développement au laboratoire WAMINE



ENSEIGNANTS-CHERCHEURS D'Oniris

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique

Directrice Générale : Dominique BUZONI-GATEL

<u>DEPARTEMENT DE BIOLOGIE, PATHOLOGIE ET SCIENCES DE L'ALIMENT (BPSA)</u>		
NUTRITION et ENDOCRINOLOGIE	Patrick NGUYEN (Pr) Henri DUMON (Pr)	Brigitte SILIART (Pr) Lucile MARTIN (Pr)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Yassine MALLEM (MC) Martine KAMMERER (Pr)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (Pr) Jean-Marie BACH (Pr)	Grégoire MIGNOT (MC) Julie HERVE (MC)
HISTOLOGIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Jérôme ABADIE (MC)	Frédérique NGUYEN (MC) Marie-Anne COLLE (Pr)
	François MEURENS (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Emmanuelle MOREAU (MC)
BIOCHIMIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Laurent LE THUAUT (MC) Thierry SEROT (Pr) Joëlle GRUA (MC)	<i>Carole PROST (Pr)</i> Florence TEXIER (MC) Mathilde MOSSER (MC) Clément CATANEO (MC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de travaux) Bernard ONNO (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Emmanuel JAFFRES (MC) Nabila BERREHRAH-HADDAD (MC)
<u>DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE (SAESP)</u>		
HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS(Pr) Fanny RENOIS (MC)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELIER (Pr)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr émérite) Catherine BELLOC (MC) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (Pr) Mily LEBLANC MARIDOR (MCC)
PARASITOLOGIE AQUACULTURE FAUNE SAUVAGE	Monique L'HOSTIS (Pr)	Guillaume BLANC (MC)

	Alain CHAUVIN (Pr) Albert AGOULON (MC)	Ségolène CALVEZ (MC) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)
MALADIES REGLEMENTEES, REGLEMENTATION SANITAIRE ZONOSSES	Jean-Pierre GANIERE (Pr émérite) Carole PEROZ (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC)
ZOOTECHE	Aurélien MADOUASSE (MCC) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr)
<u>DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES (DSC)</u>		
ANATOMIE COMPAREE	Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE ET ANESTHÉSIOLOGIE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC) Caroline TESSIER (MC)	Gwenola TOUZOT-JOURDE (MCC) Olivier GEFFROY (Pr) Eric GOYENVALLE (MC)
DERMATOLOGIE PARASITOLOGIE DES CARNIVORES ET DES EQUIDES MYCOLOGIE	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MC)
MEDECINE INTERNE, IMAGERIE MÉDICALE et LEGISLATION PROFESSIONNELLE	Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE-MALBLANC (Pr) Catherine IBISCH (MC) Nicolas CHOUIN (MC)	Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECAT (MC) Françoise ROUX (MC)
BIOTECHNOLOGIES et PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr)	Lamia BRIAND-AMIRAT (MC) Djemil BENCHARIF (MC)

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES ALIMENTAIRES

Lionel BOILLEREAUX (Pr)	Vanessa JURY (MC)
Sébastien CURET PLOQUIN (MC)	Alain LEBAIL (Pr)
<i>Marie DE LAMBALLERIE (Pr)</i>	Catherine LOISEL (MC)
Dominique DELLA VALLE (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC)
Francine FAYOLLE (Pr)	Denis PONCELET (Pr)
Michel HAVET (Pr)	Olivier ROUAUD (MC)
Dr TOUBLANC Cyril (MC)	Laurence POTTIER (MC)

DEPARTEMENT DE MANAGEMENT, STATISTIQUES ET COMMUNICATION

MATHEMATIQUES, STATISTIQUES - INFORMATIQUE	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr)	Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PCEA) Evelyne VIGNEAU (Pr)
ECONOMIE – GESTION - LEGISLATION	Pascal BARILLOT (MC) Yvan DUFEU (MC)	<i>Jean-Marc FERRANDI (Pr)</i> Sonia EL MAHJOUB (MC)

	Florence BEAUGRAND (MC)	Samia ROUSSELIERE (MC) Sybille DUCHAINE (MC)
COMMUNICATION - LANGUES	Franck INSIGNARES (PCEA) Linda MORRIS (PCEA) David GUYLER (PCEA)	Marc BRIDOU (PCEA) Shaun MEEHAN (PCEA) Fabiola ASENCIO (PCEA)

Pr : Professeur,

Pr A : Professeur Associé,

Pr I : Professeur Invité,

MC : Maître de Conférences,

MCC : Maître de Conférences Contractuel,

AERC : Assistant d'enseignement et de recherches,

PLEA : Professeur Lycée Enseignement Agricole,

PCEA : Professeur certifié enseignement agricole

*if*ce

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



Wamine

Phytothérapie et Micronutrition Animales



La reproduction d'extraits est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit :

PINEAU, V. (2016). Impact d'un extrait standardisé d'une algue rouge *Porphyra umbilicalis* PORPHYRAL HSP ND sur Hsp72, IL-6 et TNF- α . Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes. Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 118p.

Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et passible de sanctions allant jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000 euros d'amende.

Remerciements

Au Professeur Yves Maugars,

Professeur à la faculté de médecine de Nantes,
Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommage respectueux.

A Madame Anne Couroucé,

Professeur à ONIRIS,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse,
Sincères remerciements.

A Julie Hervé,

Maître de conférences à ONIRIS,
Qui a aimablement accepté d'être assesseur et d'étudier ce travail avec attention,
Sincères remerciements.

A Claude Faivre,

Responsable scientifique et développement de Wamine, Larena santé,
Pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail de thèse,
Sincères remerciements.

A Isabelle Guinobert,

Chargée de recherche chez Pileje,
Pour sa gentillesse et sa disponibilité,
Sincères remerciements.

A Isabelle Burgaud et Xavier Goupil,

Vétérinaires à l'Ecole Nationale d'Equitation,
Pour m'avoir accueillie à l'ENE et aidée lors des expériences,
Sincères remerciements.

A Eric Richard,

Chef du service de recherche en biologie clinique au LABEO Frank Duncombe,
Pour sa gentillesse et sa disponibilité,
Sincères remerciements.

A Chantal Thorin,

Professeur certifiée à ONIRIS,
Pour son aide précieuse et ses conseils avisés en statistiques,
Sincères remerciements.

A tous les chevaux, cavaliers et soigneurs du Cadre Noir de Saumur qui ont participé à cette étude,
Sincères remerciements.

Je dédie cette thèse à ma famille

Papa, Maman, je vous aime

Merci pour votre présence au fil des ans, en prépa et en école, j'espère vous rendre fiers
Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez inculquées

Soizic, little soeurette, merci pour tous ces moments à Paris, à Bailleul, à Belle Île, tu es toujours là pour moi

Belle, intelligente, curieuse, entreprenante, je n'ai pas assez d'adjectifs pour te qualifier
Tu as toute mon admiration et je suis très fière de toi

Loïc, mon petit frère, tu as toujours 11 ans dans ma tête mais je te vois grandir et j'aime la personnalité que tu te forges

Je te souhaite de trouver un métier qui te donnera l'impression de ne pas travailler et de vivre tes passions

Auguste et Paulette, votre amour et votre soutien sont inconditionnels, merci pour ces moments partagés à Noirmoutier et à Paris

Eliane, ton optimisme et ton dynamisme font mon admiration, merci pour ta présence et ton amour, et surtout merci pour Belle Île

Emile, ton rire restera toujours présent, tu es parti trop tôt, ton souvenir m'accompagne

Jean-Ma et Françoise, qui m'ont accueillie à maintes reprises à Paris et se sont occupés de moi comme de leur propre fille pendant la prépa, merci, ces moments passés ensemble me manquent

Michelle, ma marraine et **Robert**, qui trouvent toujours un moment pour moi à Vannes, j'aime nos soirées d'échange et de partage

Sylvie et Sylvain, les parisiens que je ne vois pas assez souvent, à très vite à Noirmoutier ou ailleurs

Olivier et Noëlle, les bordelais qui trouvent toujours du temps pour partager un repas avec nous sur la route des Pyrénées, les pâtisseries d'A la Folie sont les meilleures !

Gérald, mon parrain, merci pour ta présence et ton soutien années après années
Tes lettres et tes attentions m'ont toujours touchées, nous ne nous voyons pas assez, à bientôt à Tours ou à Bruxelles

A Ugo

A ces années passées ensemble et aux prochaines, ici ou ailleurs

A l'amour et aux voyages

A la famille Pelay qui m'a accueillie comme une des leurs, merci

A mes cousins et cousines

Valentine, nantaise dont je n'ai pas assez profité, à bientôt au Canada, j'espère que tu pourras aboutir ton projet de vie là-bas

Sandrine, artiste aux milles talents, j'adore nos conversations Whatsapp et j'ai à chaque fois hâte de te retrouver, merci pour ces magnifiques invitations

Marianne, organisatrice en chef des grands jeux en famille, pleine d'énergie et modèle de zénitude

Baptiste, le casse-cou, toujours une blague à raconter

Axelle, amoureuse des chevaux, ta bonne humeur à toute épreuve est un vrai bonheur

Elise, discrète et passionnée des animaux, aie confiance en toi

Gwen, Tristan et Evan, que je ne vois pas assez souvent

Priscilla, retrouvée récemment, c'est un plaisir de te découvrir

A toute la famille Pineau élargie, et à tous ces bons moments que nous passons ensemble à Beausse ou ailleurs

Une pensée particulière pour Bernard et Jean-Paul Piton et leur famille, mes cousins avec qui tout a commencé, pour cette passion commune qui nous anime

A mes amies du Nord

Marjorie, tu es la meilleure

Tu es toujours là pour moi et je n'ai pas assez de mots pour te dire combien tu comptes dans ma vie
A tous ces moments partagés depuis qu'on se connaît, et aux prochains, que j'espère nombreux
Big Bisous Belle Blonde

Roxane, ton amitié, ton soutien et tes conseils sont précieux

J'ai de la chance de te compter parmi mes amies

Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans la fin de tes études (parce que, non, ce n'est pas moi la dernière), j'ai hâte de lire ta thèse

Aux belles rencontres des vacances

Louise, pour ton sacré caractère, tous nos moments à Belle Île et notre attirance commune pour diminuer notre bilan carbone

Merci mille fois pour ces superbes schémas et tes encouragements

Géraldine, pour tous ces bons moments partagés à Paris, Belle Île ou en festival

Ton sourire et tes conseils sont précieux

J'espère partir à l'autre bout du monde avec toi

Notre amitié compte beaucoup pour moi, j'espère que le rituel du week-end à Belle Île début juin perdurera !

Erwanito, Tristan et Kevin, mes bretons du Poitou préférés

Marine, j'espère qu'on réussira à se revoir, en France, au Canada ou ailleurs !

La team Belle Île, les vacances sont plus folles avec vous, vivent les crêpes et les galettes !!!
Pour toutes ces rencontres au coin du feu, les sons et les après-midi à Donnant

Les Toulousains et les Sudistes, **Anto, Léo, Baptiste, Antoine, Bastien, Clovis, Paul, Nico, Timo**, votre accent du sud me manque ...

A Belle-Île, joyau de Bretagne, détentrice des plus beaux moments de ma vie
Je reviendrai inlassablement

Aux rencontres faites sur les bancs de l'école

Marie et Juliette, je vous adore, la prépa est déjà si loin et j'espère ne jamais vous perdre de vue, merci pour ces années d'amitié

Maud et Agathe, mes colloqs d'amour (et Fibus et Darwin) ! Merci pour cette année riche et géniale passée à vos côtés

Marie, ma colloc pouffe équine, toujours chic, nos soirées Castle et nos discussions me manquent

Flore et Laurène, les plus belles, pour tout ce temps passé à en baver en prépa et surtout pour les moments après

Pauline, on s'est suivies depuis le lycée et soutenues en prépa, à très vite dans le Nord pour repartir explorer la campagne à vélo

Pauline, Mathu, Salim, Sam, Florian, Mémé, Milia, Jean, Grand Paul, Victor, Louis, Cyrielle, Doudou, Thomas, Clémence, Louis, Cyril, Olivier, Gaetan, et tous ceux et celles dont j'ai oublié le nom, grosse pensée pour l'internat et Marcelin Berthelot et ces folles soirées de fête ou de révisions (surtout de révisions)

L'équipe de 4A de choc : **Emilie, Cécilia, Marie, Tristan**, merci de m'avoir si bien accueillie parmi vous, je n'aurais pas pu trouver mieux comme groupe de clinique
J'espère continuer à vous croiser pendant les années à venir

Mes super co-5A ! Merci pour cette année de folie, j'ai rencontré des filles géniales et talentueuses, les poneys n'ont qu'à bien se tenir

Emilie, ma Milie Jolie, mon italienne au cœur immense, toujours présente pour me soutenir, je suis heureuse de te compter parmi mes amies, merci pour tout

Caro, quand est-ce qu'on repart en balade en Normandie ? Le Cirale et surtout nos pauses thé-chocolat au soleil me manquent

Justine, ma voisine toujours de bonne humeur et toujours prête à donner un coup de main, pilier de ce super groupe de 5A, tu trouves toujours les mots justes

Julie, ton fameux caractère ne m'aura pas empêchée de t'apprécier énormément, j'ai adoré notre binôme de garde/astreinte aux nuits mouvementées et ton sourire

Alizée, ma belle, tu es une fille adorable que j'ai de la chance de connaître
Pour tous nos moments sport et (il faut l'avouer) restaurants

Poppy, ovni que j'adore, merci pour tous ces moments, tu mets de la bonne humeur et de la folie partout où tu passes

A très vite sur Facebook, en Australie ou ailleurs
Team Wallace !

A tous ceux que j'ai côtoyés plus ou moins longtemps et que j'ai appréciés : les **Black Ratés**, les **Pin at Ass**, l'**Anoph**, les **élus**, la **Cervoiserie**, mes parrains et marraines, mes poulots, Nantais, Toulousains, Alforiens, Lyonnais, j'espère garder le contact avec le plus grand nombre d'entre vous, vous avez rythmé mes années à l'école et c'était vraiment bien !

Merci à tous les professeurs rencontrés au cours de ma scolarité

Un merci tout particulier l'équipe du **CISCO** (et les différentes générations d'internes que j'ai pu croiser)

Merci pour votre soutien et l'inspiration que vous donnez à ma carrière future : Emmanuelle, Anne, Eric, Isabelle(s), Nath, Frede ...

Pour toutes les rencontres au fil des ans qui m'ont faites femme et vétérinaire

A Moun, le chat d'une vie

A Achille, Léo et Cindy, mes boules de poils

A tous les animaux qui peuplent notre planète bleue

A la nature, pour toutes les merveilles qu'elle nous offre

« Tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais »

Xavier Dolan

Table des matières

REMERCIEMENTS	9
TABLE DES MATIERES	23
LISTE DES FIGURES	25
LISTE DES TABLEAUX	27
LISTE DES ABREVIATIONS	29
INTRODUCTION.....	31
PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	33
I) LES HSP	34
A) <i>Rôle des HSP</i>	35
1. Chaperons moléculaires.....	35
2. Différenciation cellulaire.....	38
3. Immunité	39
4. Signalisation intracellulaire	40
5. Apoptose.....	40
6. Protection dans certaines maladies neurodégénératives	41
7. Aggravation dans certains cancers.....	41
B) <i>Hsp 72</i>	42
1. Présentation.....	42
2. Etat actuel des connaissances sur Hsp72.....	43
3. Hsp72 dans cette étude	45
II) LE TNF- α	46
A) <i>Rôle de TNF-α</i>	46
B) <i>Présentation</i>	47
1. Caractéristiques	47
2. Mode d'action.....	47
C) <i>Autres rôles joués par TNF-α</i>	51
1. Protection par des anticorps anti-TNF- α	51
2. Métabolisme adipeux et glucidique.....	51
III) LES INTERLEUKINES 6, UNE GRANDE FAMILLE, FOCUS SUR IL-6	52
A) <i>Rôle des interleukines 6</i>	52
B) <i>Présentation de IL-6</i>	53
1. Caractéristiques	53
2. Mode d'action.....	54
C) <i>Autres rôles joués par IL-6</i>	56
1. Cytokine pléiotropique dans le système immunitaire	56
2. Impacts variés et importants dans le métabolisme	56
3. Rôle d'IL-6 dans la douleur.....	57
IV) LE STRESS OXYDANT CHEZ LE CHEVAL ATHLETE	58
A) <i>Le stress oxydant</i>	58
B) <i>Défense cellulaire</i>	61
C) <i>Dommages créés par les ERO</i>	64
1. Lipides	64
2. Protéines.....	64
3. ADN.....	64
D) <i>Evaluation du stress oxydant</i>	65
1. Comment évaluer le stress oxydant.....	65
2. Stress oxydant en pratique	66
V) EXERCICE PHYSIQUE ET IMPLICATION DE HSP72, IL-6 ET TNF- α	66

A) <i>Hsp72 et exercice physique</i>	66
1. Stress thermique	66
2. Stress oxydant	66
3. Acidose	66
4. Stress énergétique	66
5. Actions dans les cellules musculaires	67
B) <i>IL-6, TNF-α et exercice physique</i>	69
C) <i>Lien entre ces différentes protéines de l'inflammation</i>	70
1. Lien entre IL-6 et TNF- α	70
2. Lien entre Hsp72 et TNF- α	71
3. Lien entre Hsp72 et IL-6	72
VII) LE PROTEOSTRESS EQUIN	72
A) <i>En 2012</i>	72
1. Le PORPHYRAL HSP ND	73
2. La vitamine E	78
B) <i>Retours de la pratique en clientèle privée en 2013</i>	80
1. En canine	80
2. En équine	81
C) <i>Aujourd'hui</i>	81
DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	83
I) EXPERIENCE MENEES EN 2012 A L'ECOLE NATIONALE D'EQUITATION	84
A) <i>Les différents acteurs</i>	84
1. Le laboratoire Wamine	84
2. L'Ecole Nationale d'Equitation	85
3. Le LABEO Frank Duncombe	86
4. Le laboratoire des courses hippiques (LCH)	86
B) <i>Etude de l'impact de Proteostress équin sur certains marqueurs biologiques systémiques</i>	87
1. Matériel et méthode	88
2. Résultats et statistiques	91
III) DISCUSSION	96
A) <i>Etude « dopage »</i>	96
B) <i>Etude « HSP »</i>	96
1. Population étudiée	96
2. Protocole	97
3. Prélèvements et analyses	98
4. Comparaison des résultats de cette étude à la bibliographie	99
CONCLUSION	103
ANNEXES	105
ANNEXE 1	105
ANNEXE 2	105
ANNEXE 3	107
ANNEXE 4	107
ANNEXE 5	108
ANNEXE 6	109
BIBLIOGRAPHIE	111

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : MECANISME D'ACTION DE Hsp90 - ISSU DE (ARRIGO 2005).....	36
FIGURE 2 : ACTIVATION ET CONTROLE DE LA REPONSE HSP APRES L'EXERCICE – ADAPTE PAR LMC DE (NOBLE, MILNE, ET MELLING 2008)	38
FIGURE 3 : ROLE DES HSP DANS L'IMMUNITE INNEE ET ACQUISE - ISSU DE (SRIVASTAVA 2002)	40
FIGURE 4 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE HSP70, CONFORMATION OUVERTE A GAUCHE ET FERMEE A DROITE - ISSU DU SITE HSP70.COM	42
FIGURE 5 : STRUCTURE DU TNF-A - ISSU DU SITE RCSB.ORG	47
FIGURE 6 : ILLUSTRATION DU PHENOMENE DE "LIGAND PASSING" – ADAPTE PAR LMC DE (KSONTINI, MACKAY, ET MOLDAWER 1998)	48
FIGURE 7 : SCHEMA DE PRODUCTION DE TNF-A LORS D'INFLAMMATION – ADAPTE PAR LMC DE (BAUGH ET BUCALA 2001).....	50
FIGURE 8 : MECANISMES MOLECULAIRES DE L'EFFET DU TNF-A SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE - ISSU DE (PERALDI ET SPIEGELMAN 1998)	52
FIGURE 9 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'INTERLEUKINE 6 - ADAPTE D'APRES (HUNTER ET JONES 2015)	53
FIGURE 10 : MODE D'ACTION DE L'INTERLEUKINE 6 – ADAPTE PAR LMC DE (GADIENT ET OTTEN 1997)	54
FIGURE 11 : ILLUSTRATION DE DEUX FORMES DE SIGNALISATION DE L'INTERLEUKINE 6 – ADAPTE PAR LMC DE (SCHELLER ET AL. 2011)	55
FIGURE 12 : MODE D'ACTION DES RECEPTEURS A IL-6 EN CAS DE REACTION INFLAMMATOIRE – ADAPTE PAR LMC DE (SCHELLER ET AL. 2011)	55
FIGURE 13 : CHAINE DE RESPIRATION MITOCHONDRIALE OU DE PHOPHORYLATION OXYDATIVE - ISSU DE (DUBOIS ET AL. 2015), ADAPTE D'APRES (ALCARAZ, GUALILLO, ET SANCHEZ-PERNAUTE 2013)	60
FIGURE 14 : MECANISME DU "RESPIRATORY BURST" OU FLAMBEE RESPIRATOIRE DES PHAGOCYTES – ADAPTE D'APRES (MOQUET 2016)	61
FIGURE 15 : ALTERATIONS DE L'ADN ENTRAINEES PAR UN STRESS OXYDANT - ISSU DE (DUBOIS ET AL. 2015) ET ADAPTE D'APRES FAVIER, 2003, DELATTRE, 2003 ET WEBB AND TWEDT, 2008.....	65
FIGURE 16 : EFFET DE L'EXERCICE SUR LA CELLULE MUSCULAIRE STRIEE SQUELETTIQUE – ADAPTE PAR LMC DE (NOBLE, MILNE, ET MELLING 2008)	68
FIGURE 17 : ACTIONS DE L'INTERLEUKINE 6 AU COURS DE L'EXERCICE PHYSIQUE – ADAPTE PAR LMC DE (PEDERSEN, STEENSBERG, ET SCHJERLING 2001).....	70
FIGURE 18 : LIEN ENTRE LA PRODUCTION DE Hsp70 ET CELLE DE TNF-A – ADAPTE PAR LMC DE (WIRTH ET AL. 2003)	71
FIGURE 19 : FICHE DU PROTEOSTRESS EQUIN - ISSU DE LA FICHE PRODUIT WAMINE	73
FIGURE 20 : TEST AU DPPH D'UN EXTRAIT DE <i>PORPHYRA UMBILICALIS</i> - ISSU D'UN DOCUMENT INTERNE PILEJE.....	74
FIGURE 21 : TEST DE LA RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE D'UN EXTRAIT DE <i>PORPHYRA UMBILICALIS</i> – ISSU D'UN DOCUMENT INTERNE PILEJE	74
FIGURE 22 : TEST KRL D'UN EXTRAIT DE <i>PORPHYRA UMBILICALIS</i> - ISSU D'UN DOCUMENT INTERNE PILEJE.....	75
FIGURE 23 : EFFET DE L'EXTRAIT DE <i>PORPHYRA UMBILICALIS</i> SUR LE NOMBRE DE LESIONS DE L'ADN INDUITES PAR LES UV - ISSU D'UN DOCUMENT INTERNE PILEJE	76
FIGURE 24 : EXPRESSION DE Hsp70 APRES UN CHOC THERMIQUE AVEC ET SANS TRAITEMENT AU PORPHYRAL HSP ND - ISSU D'UN DOCUMENT INTERNE PILEJE	77
FIGURE 25 : WESTERN BLOT AVEC ET SANS TRAITEMENT AU PORPHYRAL HSP ND	77
FIGURE 26 : FORMULE DE L'A-TOCOPHEROL – ISSU DE (DUBOIS ET AL. 2015).....	78
FIGURE 27 : CAPACITE ANTIOXYDANTE DU SANG AU COURS DU TEMPS - ISSU DE (REY ET AL. 2013).....	79
FIGURE 28 : DOMAINES D'UTILISATION DU PROTEOSTRESS PETITS ANIMAUX ND - ISSU DES DONNEES DE L'ENQUETE REALISEE PAR WAMINE AUPRES DE 20 PRATICIENS EN 2013	80
FIGURE 29 : THERAPIE ADJUVANTE AU PROTEOSTRESS PETITS ANIMAUX – ISSU DES DONNEES DE L'ENQUETE REALISEE PAR WAMINE AUPRES DE 20 PRATICIENS EN 2013.....	81
FIGURE 30 : DEROULEMENT DES DEUX EXPERIENCES "HSP" ET "DOPAGE".....	87
FIGURE 31 : CONTENU DU BERLINGER BERGER HORSE KIT - ISSU DU MANUEL DU LCH DESTINE AUX VETERINAIRES SUR LE TERRAIN	89
FIGURE 32 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE MOYENNE EN Hsp72 A J0 ET J2	92
FIGURE 33 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE INDIVIDUELLE EN Hsp72 AU COURS DU TEMPS	92
FIGURE 34 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE MOYENNE EN IL-6 A J0 ET J2	93
FIGURE 35 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE INDIVIDUELLE EN IL-6 AU COURS DU TEMPS	94
FIGURE 36 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE MOYENNE EN TNF-A A J0 ET J2	95

FIGURE 37 : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SERIQUE INDIVIDUELLE EN TNF-A AU COURS DU TEMPS.....	95
FIGURE 38 : SCHEMA ILLUSTRANT LE MECANISME DE L'ELISA SANDWICH - ISSU DU MANUEL D'UTILISATION DU KIT ENZO LIFE SCIENCES	106
FIGURE 39 : EXEMPLE DE COURBE ETALON POUR LA LECTURE DE LA CONCENTRATION EN TNF-A - ISSU DU MANUEL D'UTILISATION DU KIT R&D SYSTEMS.....	106
FIGURE 40 : TRACE DU PARCOURS DE CROSS.....	107

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : PRINCIPALES FAMILLES DE HSP ET LEURS MEMBRES - ADAPTE D'APRES (SRIVASTAVA 2002)	34
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX INDUCTEURS DE LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE - ISSU DE (WIRTH ET AL. 2003)	43
TABLEAU 3 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE PARTIELLE D'ÉTUDES EXPÉRIMENTALES SUR LES HSP	44
TABLEAU 4 : REVUE DES POSSIBILITÉS DE RÉPONSE CELLULAIRE AU STRESS	46
TABLEAU 5 : COMPARAISON DE QUELQUES VALEURS PHYSIOLOGIQUES CHEZ L'HOMME ET LE CHEVAL DE COURSE, AU REPOS ET A L'EFFORT - ADAPTE D'APRES (HODGSON, MCKEEVER, ET MCGOWAN 2014)	58
TABLEAU 6 : NOMENCLATURE DES DIFFÉRENTES ESPÈCES RÉACTIVES - ISSU DE DUBOIS, 2015, ADAPTE D'APRES (HALLIWELL ET GUTTERIDGE 2015).....	58
TABLEAU 7 : APÉRÇU DES MOYENS ANTIOXYDANTS POSSEDES PAR LA CELLULE - ISSU DE (KIRSCHVINK 2013)	62
TABLEAU 8 : COMPOSITION DU PROTEOSTRESS ÉQUIN - ISSU DE LA FICHE PRODUIT WAMINE.....	72
TABLEAU 9 : CONCENTRATIONS MOYENNES (ÉCARTS-TYPE) EN Hsp72, IL-6 ET TNF- α A J0	91
TABLEAU 10 : CONCENTRATIONS MOYENNES (ÉCARTS-TYPE) EN Hsp72, IL-6 ET TNF- α A J2	91
TABLEAU 11 : LISTE DES OBSTACLES DU CROSS	107
TABLEAU 12 : CONCENTRATIONS SÉRIFIQUES EN Hsp72, IL-6 ET TNF- α AU COURS DU TEMPS POUR CHAQUE SUJET	108

LISTE DES ABBREVIATIONS

$^1\text{O}_2$: oxygène singulet	ERK : extracellular regulated kinase
Ac : anticorps	ERO : espèces réactives de l'oxygène
ADN : acide désoxyribonucléique	FC : fréquence cardiaque
AIF : apoptosis inducing factor	FEI : fédération équestre internationale
ARN : acide ribonucléique	GF : growth factor
ARNm : ARN messenger	GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ASAT : aspartate amino-transférase	gp130 : glycoprotéine 130
Br° : brome atomique	GPX : glutathion peroxydase
Br_2 : dibrome	Grp : glucose-regulated protein
BrCl : chlorure de brome	GSK : glycogen synthase kinase
BrCl : chlorure de brome	H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
CAT : catalase	HNO_2 : acide nitreux
CCE : concours complet d'équitation	HO° : radical hydroxyle
$\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$: peroxyacétyl nitrate	HO_2° : radical hydroperoxyl
CHIP : carboxy terminus of Hsc70 interacting protein	HOBr : acide hypobromeux
CK : créatine kinase	HOCl : acide hypochloreux
Cl° : chlore atomique	HOOCO_2^- : anion peroxomonocarbonate
Cl_2 : dichlore	HSBP1 : heat shock factor binding protein 1
ClO_2 : dioxyde de chlore	Hsc : heat shock cognate
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	HSE : heat shock element
CO_2° : dioxyde de carbone	HSF1 : heat shock transcription factor 1
CO_3° : anion carbonate	HSFBP1 : heat shock transcription factor binding protein 1
COX : cyclooxygénase	HSP : heat shock protein (en général)
CPA : cellule présentatrice d'antigène	Hsp : heat shock protein (famille)
DHA : acide déhydroascorbique	<i>hsp</i> : heat shock protein (gène ou ARNm)
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle	IFN : interféron
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay	IL : interleukine
ENE : école nationale d'équitation	IL-1-ra : récepteur antagoniste à IL-1
EPS : extrait de plante standardisé	IL-6R : récepteur à IL-6

IRS-1 : insulin receptor substrate 1
 kDa : kilo Dalton
 LCH : laboratoire des courses hippiques
 LOO° : radicaux peroxydes lipidiques
 LPS : lipopolysaccharide
 MAPK : mitogen-activated protein kinase
 MEC : matrice extracellulaire
 N₂O₃ : trioxyde d'azote
 N₂O₄ : tetroxyde d'azote
 NADPH-oxydase : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
 NF-κ-B : nuclear factor κ B
 NGF : nerve growth factor
 NMDA : N-méthyl-D-aspartate
 NO⁻ : anion nitroxy
 NO : monoxyde d'azote
 NO⁺ : cation nitrosyl
 NO° : monoxyde d'azote
 NO₂⁺ : cation nitrile
 NO₂° : dioxyde d'azote
 NO₂Cl : chlorure de nitrile
 NO₃° : radical nitrate
 O₂ : anion oxygène singulet
 O₂⁻ : anion superoxyde
 O₂NOO⁻ : anion peroxydinitrate
 O₃ : ozone
 ONOCOO₂⁻ : anion nitrosoperoxydicarbonate
 ONOO⁻ : anion peroxydinitrite
 ONOOH : acide peroxydinitrique
 PGE₂ : prostaglandine E₂
 PI-3 : phosphatidylinositol 3
 PKA : phosphokinase A
 RIP : receptor interacting protein
 R-NHCl : chloramines
 RO° : radical alkoxy
 RO₂° : radical peroxy
 RO₂ONO : alkyl-peroxydinitrates
 ROOH : peroxyde organique
 ROONO : alkyl-peroxydinitrites
 RPE : résonance paramagnétique électronique
 sgp130 : forme soluble de gp130
 sIL-6R : forme soluble du récepteur à IL-6
 SOD : superoxyde dismutase
 STAT : signal transducer and activator of transcription
 TACE : TNF-α converting enzyme
 TEAC : trolox equivalent antioxidant capacity
 TNF-RI : récepteur à TNF de type I
 TNF-RII : récepteur à TNF de type II
 TNF-α : tumor necrosis factor α
 TRADD : TNF-RI-associated death-domain protein
 TRAF-2 : TNF-R-associated factor 2
 VEGF : vascular endothelial growth factor
 VO₂max : volume maximal d'oxygène
 α-TocH : α-tocophérol

Introduction

L'organisme des chevaux est soumis aux lois de l'homéostasie qui le maintiennent à l'équilibre. Celui-ci est précaire et des modifications ont lieu continuellement, apportées par exemple par un stress dû à un exercice physique, un traumatisme, le rayonnement ultra-violet ou même des médicaments ou une simple fièvre.

Plusieurs systèmes – enzymatiques et non enzymatiques – coexistent pour combattre le stress métabolique dans l'organisme et dans la cellule. Les heat shock proteins (HSP) en font partie. Ce sont les protéines solubles intracellulaires les plus abondantes et ubiquistes, constituant en général 5% des protéines intracellulaires, cette proportion pouvant monter jusqu'à 15% dans les situations extrêmes (Srivastava 2002). Ces protéines – découvertes en 1962 par Ritossa (Ritossa, 1962) – existent chez les organismes unicellulaires, invertébrés, vertébrés, et ont été conservées au cours de l'évolution (Fehrenbach et al. 2001; Wirth et al. 2003), ce qui suggère qu'elles possèdent une activité essentielle pour la survie de l'organisme.

Constitutivement, les HSP sont des « chaperons moléculaires ». Elles préviennent les interactions inappropriées au sein des protéines et défont les liaisons impropres qui pourraient se produire lors de perturbation de leur structure tridimensionnelle. Ainsi, elles repèrent les protéines anormalement repliées et choisissent de leur redonner une structure tridimensionnelle correcte ou de les envoyer dans le protéasome pour qu'elles soient dégradées.

Expérimentalement, ces protéines apparaissent lors d'un choc thermique et induisent une « thermotolérance » dans la cellule. Ce phénomène apporte également une tolérance croisée, c'est à dire que la synthèse de HSP induite par le stress thermique protège également la cellule contre d'autres origines de stress.

L'exercice physique est un facteur de stress pour l'organisme au regard des modifications métaboliques qu'il entraîne et l'inflammation induite par l'exercice est susceptible de causer une baisse des performances. L'apparition de certaines cytokines impliquées dans l'inflammation lors d'un exercice sportif, comme IL-6 ou TNF- α , peut éclairer le scientifique sur la façon dont cet exercice est toléré (Liburt et al. 2010). Néanmoins, la survenue d'une inflammation n'est pas forcément mauvaise et l'athlète en a besoin pour accroître sa masse musculaire (Marini et Veicsteinas 2010).

Le groupe LARENA Santé a développé un ingrédient agissant sur la production de HSP, le PORPHYRAL HSP ND. Les expériences menées *in vitro* et les retours cliniques concernant l'utilisation et l'efficacité du produit Proteostress Petits animaux – produit contenant du PORPHYRAL HSP ND – ont conduit le laboratoire Wamine à développer un produit pour les chevaux sur le même modèle.

Cette thèse de doctorat vétérinaire contribue à l'étude préclinique de l'efficacité du complément alimentaire Proteostress équin sur différents marqueurs de la souffrance cellulaire et de l'inflammation. L'hypothèse principale est que l'ingestion de Proteostress équin avant un effort permet à l'organisme de mieux y répondre et de diminuer les dommages induits par le stress.

Une première partie sera consacrée à l'étude de la bibliographie sur les HSP et les marqueurs de l'inflammation IL-6 et TNF- α , choisis pour suivre l'efficacité du Proteostress équin. Les ingrédients contenus dans le Proteostress équin seront également étudiés. Une deuxième partie portera sur

l'expérience menée en 2012 sur une population de chevaux de sport de l'Ecole Nationale d'Equitation. Les résultats, biais et intérêts de cette expérience y seront discutés au regard de la bibliographie et des expériences pré-existantes.

Toutes les expériences produites dans cette thèse l'ont été avec l'accord du comité d'éthique ComEth (numéro d'agrément CEEA 2012.31).

Première partie : partie bibliographique

Au cours de cette thèse, il sera fait référence :

- à la famille de protéines lors de l'utilisation de l'abréviation HSP
- à la protéine spécifique lors de l'utilisation de l'abréviation Hsp
- au gène et à l'ARNm lors de l'utilisation de l'abréviation *hsp*, comme établi par la Cell Stress Society International.

De même, il sera fait référence au complément alimentaire Proteostress solution glycinée lors de la mention Proteostress équino.

Proteostress solution glycinée est le nom commercial donné par le laboratoire Wamine au mélange actuel de l'extrait standardisé de *Porphyra umbilica* PORPHYRAL HSP ND.

Proteostress équino est le nom de l'échantillon-test qui a servi aux expérimentations en 2012.

Tous les schémas signés LMC ont été réalisés par Louise Maspero Carel et sont reproductibles avec sa permission.

I) Les HSP

Les HSP – aussi appelées protéines de stress – sont des protéines qui ont été hautement conservées au cours de l'évolution et qui sont présentes chez tous les mammifères. Elles occupent des fonctions variées et on continue actuellement à découvrir les rôles et interactions qu'elles tiennent dans l'homéostasie et la vie cellulaire au sein de l'organisme.

L'identification des HSP se fait grâce à leur poids moléculaire en kDalton déterminé sur gel d'électrophorèse. Elles sont classées en famille en fonction de leur poids moléculaire allant de 10 à 110kDa (Noble, Milne, et Melling 2008). De légères variations peuvent avoir lieu, par exemple Hsp68, Hsp70 et Hsp72 désignent la même protéine de la famille des Hsp70 (Wirth et al. 2002). Les principales familles de HSP sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : principales familles de HSP et leurs membres - adapté d'après (Srivastava 2002)

Famille de HSP	Membres	Localisation intracellulaire
Petites HSP	Hsp10, GROES, Hsp16, α -crystalline, Hsp20, Hsp25, Hsp26, Hsp27	Cytosol
HSP40	Hsp40, DNAJ, SIS1	Cytosol
HSP47	Hsp47	Réticulum endoplasmique
Calréticuline	Calréticuline, canexine	Réticulum endoplasmique
HSP60	Hsp60, Hsp65, GROEL	Cytosol et mitochondrie
HSP70 *	Hsp72, Hsc70 (Hsp73), Hsp110/SSE, DNAK	Cytosol
	SSC1, SSQ1, ECM10	Mitochondrie
	Grp78 (BiP), Grp170	Réticulum endoplasmique
HSP90	Hsc84, Hsp86, HTPG	Cytosol
	gp96 (Grp94, Hsp108, endoplasmine)	Réticulum endoplasmique
HSP100	Hsp104, Hsp110, protéines CLP	Cytosol
	Hsp78	Mitochondrie

* avec les co-chaperons Hip, Hop et Bag-1 du couple Hsc70/Hsp70

A) Rôle des HSP

Les HSP sont produites constitutivement dans la cellule, essentiellement pour y jouer un rôle de « chaperon moléculaire ». Le rôle des protéines chaperons sera détaillé dans la partie A) 1.

Certaines HSP sont inductibles et sont transcrites lors de stress pour lutter contre les dommages et l'inflammation créés. Le rôle des HSP ne s'arrête pas là et ces protéines font partie de nombreux schémas du métabolisme cellulaire du début à la fin de la vie de l'organisme (Fehrenbach et al. 2001).

Dans une même famille de HSP, on trouve généralement des protéines constitutives et leur équivalent inductible par le stress ; une distinction a été faite dans leur dénomination pour la famille des HSP de 70kDa, Hsc70 est la protéine constitutive et Hsp70 est induite lors d'un choc thermique ou d'un stress (Wirth et al. 2002). Elles vont agir de la même façon d'un point de vue physico-chimique mais leurs cibles ne seront pas les mêmes.

1. Chaperons moléculaires

1. i – Les HSP constitutives

- *Aide au repliement des protéines pendant ou après leur traduction*

Les HSP constitutives jouent le rôle d'un contrôle de qualité pour les protéines issues du réticulum endoplasmique. Elles aident à contrôler l'homéostasie cellulaire et sont des chaperons veillant à la bonne reconformation protéique.

Hsp60, Hsp10 et Hsp90 sont exprimées à un taux très élevé dans la cellule non stressée. Hsp60 et Hsp10 existent dans la mitochondrie sous la forme d'un complexe et aident au transport des protéines codées dans la mitochondrie et synthétisées dans le cytoplasme.

Certaines protéines font le chemin inverse, Hsc70 va alors aider à linéariser ces protéines pour les laisser pénétrer dans la mitochondrie et, en association avec le complexe Hsp60/Hsp10, les repliera.

Grp78, une protéine de la famille de Hsp70, joue le rôle de contrôle qualité dans le réticulum endoplasmique (Wirth et al. 2002).

Comme vu ci-dessus dans le tableau 1, les HSP peuvent être situées dans le cytosol, le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie, ce qui leur permet d'intervenir rapidement partout dans la cellule dès qu'une transcription a lieu.

- *Prévention (ou limitation) de la dénaturation des protéines et de l'agrégation induite par un stress*

Les HSP jouent un rôle protecteur contre la cytotoxicité induite par différents stress (choc thermique, ischémie-reperfusion, stress oxydant, médicaments, ...). Le stress dénature les protéines en induisant une perte de leur conformation tridimensionnelle et aboutissant à la formation de globules fondus (ou molten globules). Ces protéines sont reconnues par les HSP constitutives et prises en charge. Leur avenir dépend de la gravité de la perte de conformation ; les protéines trop fortement touchées par le stress sont éliminées dans le protéasome (activité de protéases des HSP), les autres sont reconformées (activité de chaperonines) (Arrigo 2005).

Dans le cas d'un exercice de forte intensité, les HSP sont recrutées pour venir en aide aux protéines des fibres musculaires qui souffrent à cause de la hausse de température, du métabolisme oxydatif et des déchirures des myofibrilles. Les muscles qui sont le plus fréquemment mis à l'épreuve et souvent dans un état de stress oxydant montrent des taux de HSP plus élevés, notamment en Hsc70 (Milne et Noble 2002). Le type de HSP présent dans le muscle serait alors fonction du phénotype musculaire, de sa fonction et du type de fibres striées squelettiques. Milne et Noble affirment de plus que l'augmentation de HSP dans le muscle serait inversement proportionnelle au taux basal de Hsc70.

- *Masquage de certaines mutations*

Les HSP sont capables de rendre certaines mutations silencieuses et d'éviter à la cellule d'avoir à transcrire à nouveau une protéine quand celle-ci n'est pas bien repliée et que cela menace sa fonctionnalité (Figure 1).

Les mutations peuvent s'exprimer à différents niveaux dans la cellule et à différentes étapes de formation de la protéine. Une erreur d'un simple acide aminé est capable d'altérer le repliement de la protéine. Cette mauvaise configuration entraîne la mise en évidence de certaines zones hydrophobes qui devraient être cachées, la protéine est alors reconnue par les HSP constitutives, dont Hsp90. Hsp90 se fixe sur la protéine dénaturée pour lui redonner sa forme usuelle et ainsi masquer la mutation (Arrigo 2005).

- *Activité de modulation des autres HSP en tant que cochaperonine*

Hsp90 participe également au repliement des protéines altérées en cas de stress (partie I.A.2.) et l'activité de masquage de mutations observée ci-dessus passe alors au second plan. Certaines dysfonctions peuvent donc se manifester au moment où l'organisme est soumis à un taux élevé d'altération des protéines. Hsp90 quitte la protéine dont il masquait la mutation pour aller en renfort des HSP nouvellement induites (Arrigo 2005). La geldanamycine représentée dans la Figure 1 est une molécule expérimentale inhibitrice de Hsp90.

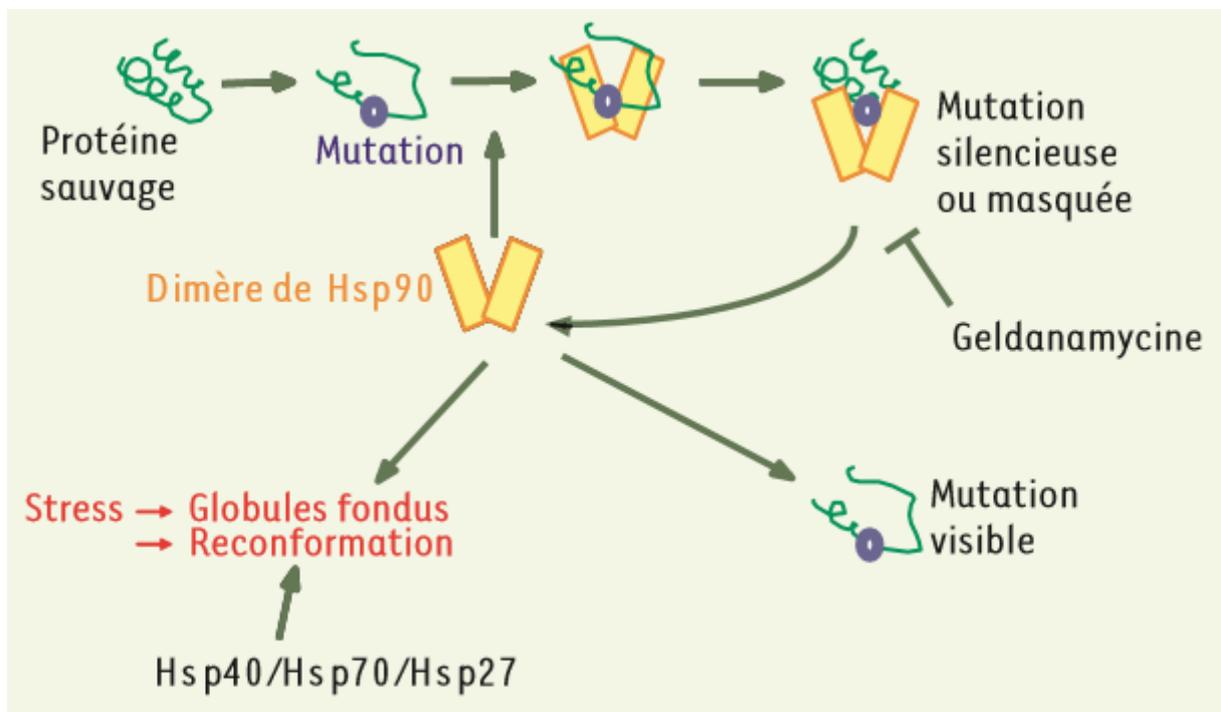


Figure 1 : mécanisme d'action de Hsp90 - issu de (Arrigo 2005)

Ces activités sont médiées par des protéines chaperons constitutives, présentes dans la cellule quel que soit son activité et le niveau de stress environnant. D'autres protéines, de la même famille mais au rôle de « pompier » sont produites en cas de détérioration de l'homéostasie.

1.ii – Les HSP induites par le stress

La production de HSP en réponse à un stress n'est pas automatique et varie en fonction des « boutons d'alarme » enclenchés. La rapidité de cette réponse fait l'efficacité des HSP à réagir à la moindre situation de stress cellulaire (Kinnunen 2011).

Plusieurs situations vont entraîner la production de nouvelles HSP. Les HSP constitutives sont sécrétées lorsque la demande en chaperons moléculaires pour aider à la synthèse et au repliement d'autres protéines augmente et les gènes des HSP inductibles sont activés lors d'accumulation de protéines mal conformées. Un déséquilibre de l'homéostasie (ou plus précisément l'oxydation des groupements thiols selon (Freeman et al. 1995) déclenche donc l'organisation en trimères du heat shock transcription factor 1 (HSF1) et la production de HSP.

Les facteurs d'induction des HSP :

- ✓ HSF1 (principal facteur d'induction chez les mammifères) est activé dans les situations de stress cellulaires. HSF1 est constitué de trois domaines : un domaine de liaison à l'ADN, un domaine utilisé dans la trimérisation et un domaine permettant l'activation de la transcription. Une séquence permettant de supprimer le rôle de HSF via une liaison avec le domaine de trimérisation joue un rôle de répresseur (Morimoto 1998).
- ✓ HSF2 est activé pendant certains stades du développement embryonnaire (Jolly et Morimoto 2000).
- ✓ HSF3 existe uniquement chez le poulet (Nakai et al. 1997; Pirkkala, Nykänen, et Sistonen 2001)
- ✓ HSF4 agit plutôt comme un inhibiteur et réduit l'expression des gènes *hsp27*, *hsp70* et *hsp90* (Nakai et al. 1997).

Les HSP se régulent elles-mêmes lors de chaque événement pouvant provoquer une dénaturation ou une déformation des protéines. En situation normale, les HSP sont fixées sur HSF1, facteur de transcription des HSP, et le maintiennent dans un état monomérique inactif. Au moindre stress, les HSP iront se fixer sur les protéines en train de se désorganiser et HSF1 ira dans le noyau après s'être organisé en trimères pour se fixer sur le promoteur heat shock element (HSE) de l'ADN. La production de nouvelles protéines de stress via le gène *hsp* commence alors.

Une voie de signalisation intracellulaire via les kinases (PKA, GSK, ERK) existe également.

Ces HSP nouvellement induites vont alors – parallèlement à leur activité *princeps* de chaperon moléculaire – se fixer sur HSF1 pour le désactiver. Le facteur HSFBP1 fait se dissocier les trimères de HSF1, qui retourne à son état monomérique cytoplasmique (Noble, Milne, et Melling 2008). La durée de l'activation est proportionnelle au nombre de protéines endommagées.

La Figure 2 présente les interactions décrites ci-dessus.

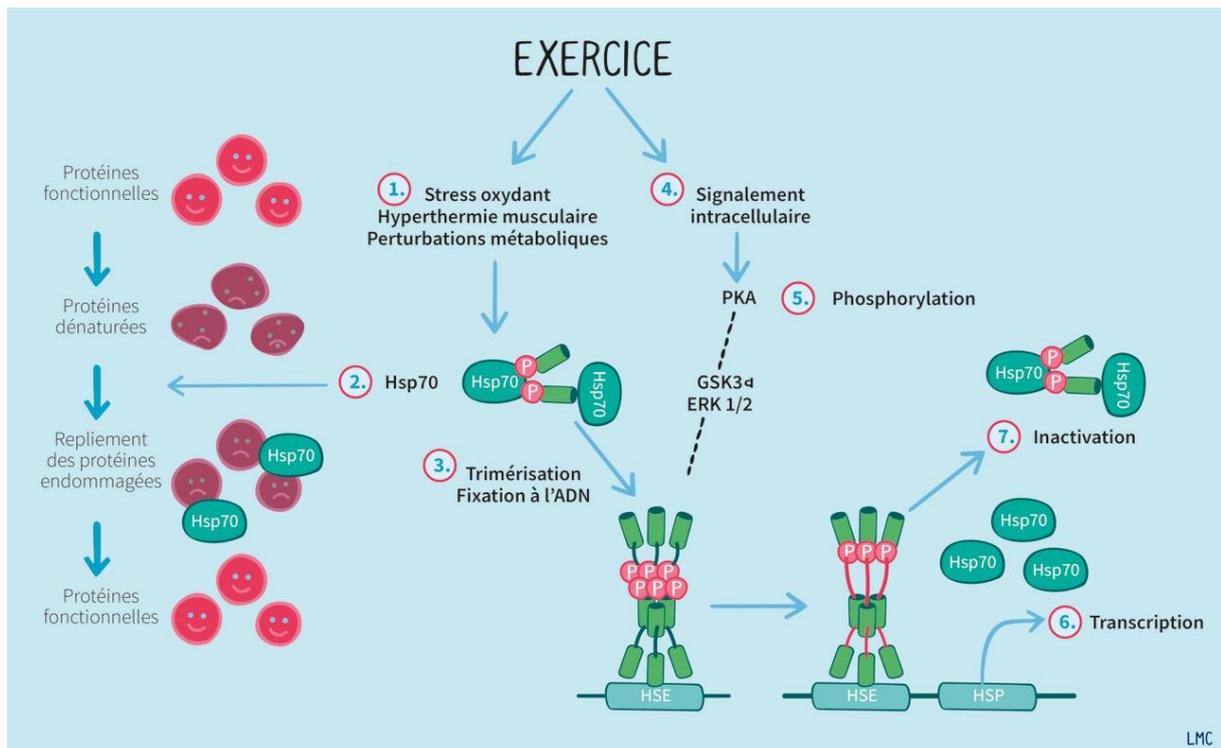


Figure 2 : activation et contrôle de la réponse HSP après l'exercice – adapté par LMC de (Noble, Milne, et Melling 2008)

Si les protéines ne peuvent pas être repliées ou que la dépense énergétique est trop grande, alors elles sont envoyées dans un protéasome pour y être détruites. La protéine CHIP interagit avec Hsp70 et Hsp90 pour coupler les protéines agrégées avec l'ubiquitine et le protéasome 26S ou 20S les dégrade.

Cette action de protéine chaperon réagissant au moindre stress pour aider la cellule à conserver son homéostasie protéique, donc sa fonctionnalité, est un des rôles principaux des HSP. Les autres rôles sont détaillés ci-dessous.

2. Différenciation cellulaire

L'expression des HSP varie au cours du développement embryonnaire, du processus de différenciation cellulaire et du cycle cellulaire.

Hsp27 et Hsp90 sont exprimées dans la cellule non stressée, et ce dès les premières étapes de formation de l'organisme. Ces protéines semblent protéger l'organisme en développement d'un potentiel stress cellulaire (Arrigo 2005).

Une isoforme non inductible d'Hsp70 activée par le gène *hsp70-2* est exprimé uniquement dans les spermatocytes et est nécessaire à la progression de la méiose des cellules germinales mâles.

Hsp-hom est activée uniquement pendant la phase post-méiotique de la spermatogenèse, vraisemblablement en tant que protéine chaperon pour aider à la réorganisation de la cellule.

Hsp47, de son côté, est étroitement liée à la formation de collagène de type I ou IV, que ce soit au cours du développement ou plus tard dans le cas de fibrose par exemple (Nagata 1998).

Les HSP ont des rôles variés et interviennent tout au long de la vie de l'organisme, dès le commencement.

3. Immunité

Les HSP participent à la réponse immunitaire innée et adaptative, en particulier Hsp70, Hsp90, gp96 et la calréticuline. La structure du site de liaison aux peptides de Hsp70 est similaire à celui des protéines d'histocompatibilité et le gène *hsp70* se localise dans le locus du CMH (Wirth et al. 2002).

Les HSP peuvent être relarguées par les cellules sévèrement endommagées pour y activer l'immunité innée et stimuler la production de cytokines inflammatoires. Cette stimulation des macrophages et des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes) se fait via la voie du facteur nucléaire κ -B (NF- κ -B) (Basu et al. 2000).

De plus, les HSP ont la potentialité de scanner tout le répertoire des protéines intracellulaires et d'informer les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) en préparant et présentant les peptides immunogènes ; les HSP peuvent en effet se lier à n'importe quel peptide et le rendre présentable au CMH. Pour ce faire, le complexe HSP-peptide se lie au récepteur CD91, lequel permet l'internalisation du complexe dans un endosome et le complexe ou le peptide seul est convoyé à travers le cytosol jusqu'au réticulum endoplasmique. Le peptide est alors pris en charge par les molécules du CMH-1 et présenté aux cellules T CD8+ par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Une faible proportion des complexes HSP-peptide est prise en charge par le CMH-2 et présenté aux cellules T CD4+ (Figure 3).

L'interaction entre les HSP et les CPA mène à la production de plusieurs cytokines comme TNF- α , IL-12, IL-1 β , GM-CSF, à l'induction de la NO-synthase, à la translocation du NF- κ -B dans le noyau, à la migration des CPA dans les ganglions périphériques (Srivastava 2002).

Il a été montré que la présentation des antigènes au CMH1 est bien plus efficace lorsqu'ils sont liés aux HSP que lorsqu'ils sont libres (Binder, Blachere, et Srivastava 2001).

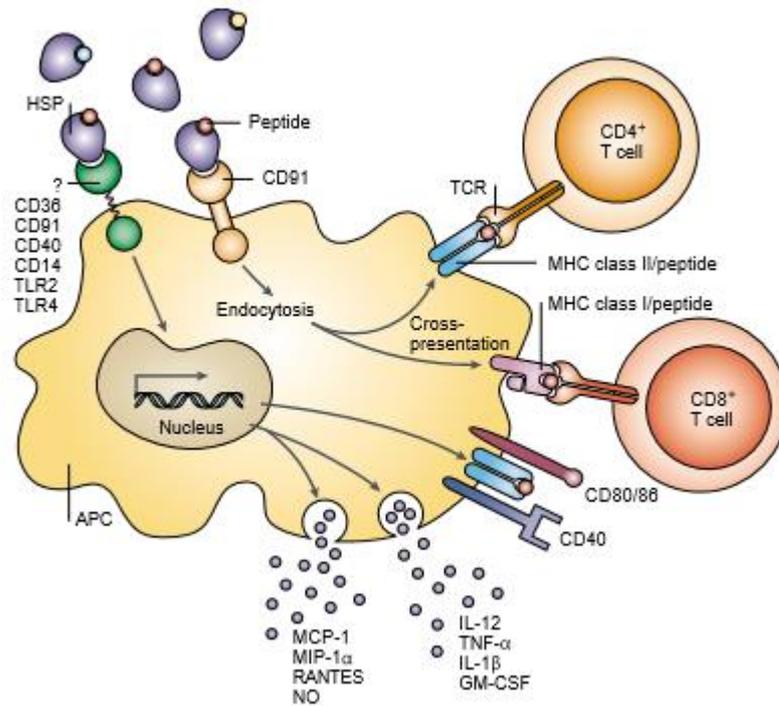


Figure 3 : rôle des HSP dans l'immunité innée et acquise - issu de (Srivastava 2002)

4. Signalisation intracellulaire

Il existe une foule d'exemples à différents niveaux, la fonction des HSP dans les voies de signalisation étant très vaste.

Hsp90 forme des complexes avec des protéines intervenant dans la transduction de signaux intracellulaires ou dans la régulation du cycle cellulaire. La liaison de l'hormone avec son récepteur provoque la libération de Hsp90 et un changement de conformation ATP-dépendant ; il y a alors translocation intranucléaire du récepteur qui activera la transcription des gènes cibles (Wirth et al. 2002). Hsp60 module le signalement d'IGF1, Hsp70 et Hsp27 interviennent dans la cascade inflammatoire en réprimant NF- κ -B, Hsp70 active la calcineurine dans les muscles à fibres lentes, ...

5. Apoptose

Les HSP ne réussissent pas toujours à sauver les cellules endommagées et certaines jouent alors un rôle pro-apoptotique.

Hsp27 joue un rôle de protection de la cellule contre l'apoptose lors de la transition mitose-état différencié. Elle interagit avec le cytochrome c pour empêcher l'activation des caspases.

De leur côté, Hsp90 et Hsp70 interfèrent avec l'apoptosis inducing factor (AIF) tandis que Hsp60 et Hsp10, relâchées ensemble de la mitochondrie avec le cytochrome c, activent les procaspases 3 en caspases 3 (Arrigo 2005).

6. Protection dans certaines maladies neurodégénératives

Les HSP pourraient jouer un rôle de protection dans le cas de maladies impliquant des dépôts de protéines, comme les maladies à prion, Alzheimer, Parkinson, Huntington.

Dans le cas de la chorée de Huntington qui se caractérise par le dépôt d'agrégats du polypeptide huntingtine modifié au niveau neuronal, la présence de HSP diminue la taille de ces agrégats et contribue à combattre la maladie (Noble, Milne, et Melling 2008).

7. Aggravation dans certains cancers

Les cellules tumorales résistent à la mort cellulaire et les HSP y contribuent malheureusement en jouant leur rôle habituel de protecteur de la cellule et de chaperon.

Certaines HSP ont des rôles anti-prolifératifs : la mutation de Grp75 via l'inactivation de p53 contribue à la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale (Wirth et al. 2002).

Qui est p53 ?

- ✓ Surnommée « le gardien du génome », p53 est une protéine de 53kDa agissant comme un facteur de transcription et ayant un rôle central dans la machinerie de réplication de l'ADN.
- ✓ Elle régule la mitose et l'apoptose ; longtemps classée parmi les oncogènes, elle fait maintenant partie des gènes suppresseurs de tumeurs.
- ✓ Son rôle est si important dans la réparation des mutations survenant dans les cellules de l'organisme que la mutation de p53 a de nombreuses conséquences, par exemple, p53 mutante est retrouvée dans près de la moitié des cancers (Fuster et al. 2007).

Hsp27, Hsp70 et Hsp90 sont constitutivement exprimées à un haut niveau dans les cellules cancéreuses et participent à la protection de cette cellule via leur activité de chaperons moléculaires. Elles interfèrent en effet avec l'activité cytotoxique des médicaments anti-cancéreux qui s'attaquent aux protéines et entraînent le déroulement de leur structure tridimensionnelle. Cette activité de chaperon est utilisée par la cellule cancéreuse pour augmenter sa survie par une certaine résistance à l'apoptose.

De plus, le rôle actif des HSP dans la transduction des signaux et leur aide au passage des protéines d'un compartiment à l'autre sont utilisés par la cellule cancéreuse pour stabiliser les mutations (il a été montré que p53 mutante se liait plus préférentiellement à Hsp70) (Jolly et Morimoto 2000).

Le rôle délétère d'une hausse de la température sur les cellules tumorales a été démontré dès 1963 (Crile 1963). La thermotolérance induite par les HSP sert à la cellule tumorale à échapper à la mort cellulaire.

L'expression de Hsp27 et de Hsp70 dans certaines cellules tumorales paraît être prédictive d'une plus grande agressivité tumorale et de la formation de métastases. Ces cellules sont aussi plus résistantes à la chimio- et radiothérapie. La présence de Hsp70 empêche le recrutement des pro-caspases 9 et 3 et la formation de l'apoptosome (Jolly et Morimoto 2000), permettant ainsi à la cellule tumorale d'échapper à la mort programmée.

Les HSP jouent donc un rôle cytoprotecteur favorisant la survie des cellules tumorales et participent activement à leur transformation. Hsp70 pourrait ainsi être utilisée en tant que marqueur du processus tumoral et marqueur pronostique par la modification de son expression (Jolly et Morimoto 2000).

Certaines études portent au contraire sur la possibilité d'utiliser les HSP dans la lutte anti-tumorale, via leurs propriétés de cellules présentatrices d'antigènes (Srivastava 2002). L'utilisation de complexes Hsp-peptides en tant qu'antigènes spécifiques tournés contre des cellules tumorales, la distribution de médicaments ou l'élimination par le système immunitaire de l'hôte sont à l'étude. Les antibiotiques ou antifongiques ciblant spécifiquement les HSP sont également à l'étude en tant que médicaments anti-tumoraux (Jolly et Morimoto 2000).

Après cette présentation non-exhaustive des HSP, un intérêt tout particulier sera apporté à Hsp72, l'isoforme inducible de la famille HSP70.

B) Hsp 72

1. Présentation

1. i – Caractéristiques

Hsp72 est l'isoforme inducible de Hsc70, et lorsqu'Hsc70 joue un rôle dans l'homéostasie de la cellule, Hsp72 est produite en cas de stress. Ces deux isoformes prennent en charge les protéines qui ont été endommagées par le stress et aident la cellule à maintenir sa capacité de synthèse protéique.

Hsp72 est située dans le cytoplasme et dans le noyau. Elle joue un rôle de chaperon moléculaire, elle est anti-inflammatoire, anti-apoptotique, participe à la réponse immunitaire et à la signalisation (Milne et Noble 2002; Noble, Milne, et Melling 2008). Hsp72 est induite par les gènes *hsp70.1* et *hsp70.3* qui sont situés dans le complexe majeur d'histocompatibilité.

Elle possède deux domaines de liaison : une extrémité carboxy-terminale pour les peptides et une extrémité amino-terminale à activité ATPase. La Figure 4 présente la structure tridimensionnelle de Hsp70.

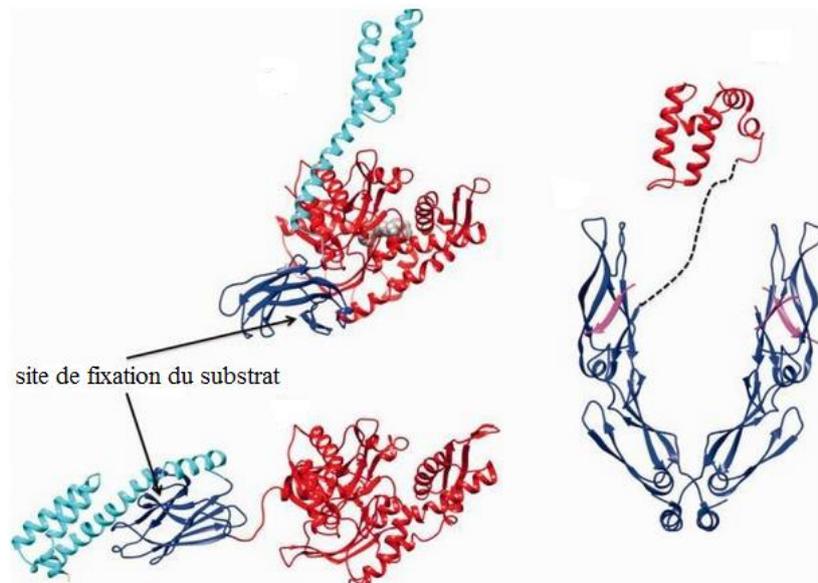


Figure 4 : structure tridimensionnelle de Hsp70, conformation ouverte à gauche et fermée à droite - issu du site hsp70.com

L'expression de Hsp72 se limite donc aux cellules soumises à des stress alors que Hsc70 est présente en faible quantité dans le cytosol de chaque cellule. Néanmoins, la valeur basale de Hsp72 est plus élevée dans les organes les plus soumis au stress car en contact avec l'extérieur comme les poumons ou la peau, comparativement avec les muscles ou le foie.

1. ii – Mode d'action

Lors d'un stress, l'altération et la dégradation des protéines entraîne la perte de leur fonction et leur agrégation. Cette agrégation fonctionne comme un signal qui active la transcription des gènes *hsp70.1* et *hsp70.3* situés dans le complexe majeur d'histocompatibilité.

Hsp72 est synthétisée (Figure 2) et reconnaît les résidus hydrophobes exposés à l'extérieur des protéines endommagées. Hsp72 se lie alors aux protéines et arrête leur agrégation ; puis les altérations sont corrigées (repliement effectué par le domaine ATP-dépendant) et les protéines irrécupérables sont envoyées dans le protéasome.

Lorsqu'il n'y a plus d'altérations, le signal cesse et la production de protéines Hsp72 également.

2. Etat actuel des connaissances sur Hsp72

2. i – Inducteurs de la synthèse d'Hsp72

Il existe plusieurs manières d'induire la synthèse d'Hsp72, mais les conditions de réalisation ne sont pas toujours faciles à mettre en œuvre en pratique.

Le Tableau 2 présente les principaux inducteurs de la synthèse de HSP.

Tableau 2 : principaux inducteurs de la synthèse de protéines de choc thermique - issu de (Wirth et al. 2003)

Conditions de stress	Etats physiopathologiques	Conditions physiologiques
Choc thermique	Fièvre, inflammation	Cycle cellulaire
Métaux lourds	Ischémie-reperfusion	Développement embryonnaire
Ethanol	Hypoxie	Différenciation cellulaire
Arsénite	Infection bactérienne, virale	Stimulation hormonale
Oxydants, radicaux libres	Cancer	Facteurs de croissance
Radiations		
Analogues d'acides aminés		
Ionophores		
Déplétion d'ATP		
Hydroxilamine		
Médicaments antinéoplasiques		
Exercice		

× **Stress**

Un stress produit par une ischémie ou un choc thermique parvient à induire Hsp72 mais est délétère pour la cellule et difficile à reproduire en expérimentation.

× **Substances chimiques**

Certaines substances sont connues pour induire la synthèse de Hsp72 et atténuer les lésions induites par le stress : le bimoclomol (Hargitai et al. 2003), l'herbimycine (Javadpour et al. 1998) ou certains AINS comme l'aspirine ou l'indométacine (Wirth 2003).

× **Injection d'un vecteur viral**

Il est également possible de fabriquer un organisme génétiquement modifié sous la forme d'un virus contenant le gène hsp70. Les expériences menées sur une population de donneurs d'organes montrent qu'ils sont mieux protégés contre l'ischémie (Jayakumar et al. 2000).

Néanmoins, il est encore difficile de savoir si l'expression de Hsp72 est une adaptation de l'organisme au stress ou le reflet d'un état pathologique.

La stratégie du laboratoire Wamine est, en se fondant sur des résultats *in vitro*, de développer un ingrédient agissant sur l'adaptation de l'organisme au stress via une synthèse plus précoce de Hsp72.

× **Le produit Proteostress**

Le Proteostress Petits Animaux ND est utilisé chez les animaux de compagnie chiens et chats. Les résultats d'une enquête Wamine chez 32 praticiens (données non publiées) se trouvent partie II B 1.

2. ii – Revue bibliographique partielle d'études expérimentales menées sur les HSP

Cinq études expérimentales sont présentées dans le Tableau 3. Le nombre de sujets dans l'étude, les paramètres mesurés et leur évaluation, ainsi que les résultats et conclusions y sont comparés.

Tableau 3 : revue bibliographique partielle d'études expérimentales sur les HSP

Référence	Sujets	Paramètres mesurés	Évaluation	Résultats, conclusion
(Pösö et al. 2002)	10 chevaux finnois 4-14 ans 553kg de poids moyen	Hsp72 Lactates	Biopsie Sang	L'exercice répété augmente le niveau de base d'expression de Hsp72 au repos
(Kinnunen et al. 2005)	8 Standardbred 6-9 ans Entraînés	Protéines carbonylées Citrate synthase β-glucoronidase Hsp70, 90, Grp75 HSF-1 ASAT	Biopsie et sang Biopsie Sang	Effort modéré en intensité et durée : pas d'augmentation de l'expression des HSP (mais augmentation du stress oxydant)
(van Ginneken et al. 2006)	6 Standardbred 26 mois d'âge moyen 429kg de poids moyen Entraînés	Hsp27 JNK p38	Biopsie	L'état de phosphorylation de Hsp27 est augmenté après exercice
(Kinnunen et al. 2009)	6 Standardbred 5-13 ans 400-508kg Entraînés	Hsc70 Hsp90 Hsp70 Hsp60 Hsp25	Biopsie	Pas d'effet d'une supplémentation en acide alpha-lipoïque sur l'expression de Hsp60, 25 et Grp75 Augmentation de l'expression au repos de Hsp70 et 90

		Grp75 Citrate synthase Lactates CK ASAT	Sang	
(Avenatti 2014)	12 Standardbred 2-25 ans	Hsp70 Hsp90	Biopsie et sang	Augmentation de l'expression de Hsp70 et Hsp90 post-effort, plus marquée et plus longue chez les sujets jeunes pour Hsp70

La plupart des études portent sur les Standardbred, équivalent américain du Trotteur Français. L'effort est fourni sur un tapis de course.

Les échantillons prélevés sont à chaque fois du sang par veinoponction et un morceau de muscle par biopsie.

La majorité des conclusions montre que l'exercice a un effet sur les HSP.

Il n'existe pas à ce jour d'étude concernant l'utilisation d'extraits de plantes standardisés pour améliorer la capacité de l'organisme à réagir au stress via les HSP.

3. Hsp72 dans cette étude

Les axes de recherche actuels autour de Hsp72 s'appliquent à utiliser son expression en tant que biomarqueur de la souffrance cellulaire et l'exploiter en tant que protecteur de cellules stressées (Wirth et al. 2003).

3. i – Rôle de biomarqueur

Il y aurait un lien direct entre le niveau de la réponse via Hsp70 et les dommages appliqués à l'organisme : la réponse en Hsp70 est fonction de la nature et de la concentration en toxique et de la durée d'application de celui-ci (Snyder, Girvetz, et Mulder, 2001). L'expression de Hsp70 peut aussi être prédictive de lésions survenant au cours d'une pathologie, lors d'ischémie-reperfusion par exemple (le toxique étant alors constitué par les ERO), la réponse étant alors proportionnelle au degré de lésions.

3. ii – Rôle de protecteur cellulaire

Hsp70, générée en grande quantité, offre une protection accrue au stress, entre autres une thermotolérance lors d'un choc thermique et une tolérance croisée après un choc thermique ou un stress d'une autre nature. Au contraire, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de Hsp70 augmente la sensibilité au stress.

Ainsi, le but des expériences sera de qualifier et/ou de quantifier la réponse de l'organisme au stress via Hsp72 induit par l'exercice physique. Le monitoring de l'induction de Hsp70 dans les cellules stressées (par des biopsies) ou celui de la concentration en Hsp70 dans la circulation générale (par des prises de sang) permet d'apprécier cette réponse.

Il existe plusieurs situations de réponse au stress possibles. Ces situations sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : revue des possibilités de réponse cellulaire au stress

Cellules insensibles au stress	Ne synthétisent pas Hsp70 <i>ni biomarqueur ni protecteur</i>
Cellules sensibles à un stress modéré	Hsp70 protège les cellules contre ce stress et ultérieurement <i>biomarqueur et protecteur</i>
Cellules sensibles mais stress fort	Hsp70 est synthétisé mais incapable de protéger les cellules <i>biomarqueur mais pas protecteur</i>
Cellules sensibles mais stress léthal	Hsp70 n'est pas synthétisé car la cellule meurt <i>ni biomarqueur ni protecteur</i>

L'exploitation de ces qualités dans le travail expérimental va être mise en œuvre, le but étant d'apprécier la capacité du produit Proteostress équin à augmenter la réponse en Hsp72 de l'organisme soumis au stress d'un exercice physique intense.

Deux autres biomarqueurs seront évalués : IL-6 et TNF- α .

IL-6 et TNF- α sont deux cytokines impliquées dans l'inflammation ; il est détaillé ci-dessous pourquoi elles peuvent être classées à la fois dans la catégorie des cytokines pro- et anti-inflammatoires.

II) Le TNF- α

A) Rôle de TNF- α

Le Tumor Necrosis Factor α , ou TNF- α , fait partie d'une superfamille d'une dizaine de molécules caractérisées par la présence de plusieurs séquences répétées riches en cystéine. La famille des TNF comprend TNF- α , appelée cachectine alors de sa découverte et TNF- β aussi connu sous le nom de lymphotoxine α . Ces molécules ont en commun d'induire la mort cellulaire, par nécrose ou par apoptose. Seul TNF- α sera étudié ici.

TNF- α est une cytokine produite entre autres par les macrophages activés et qui est capable de provoquer la nécrose de certaines cellules tumorales. TNF- α peut activer les médiateurs de l'inflammation (fonction de protection de l'organisme), tout en étant fortement impliquée dans la médiation de l'apoptose, elle a donc deux rôles antagonistes et les mécanismes de décision ne sont pas encore tous connus (Tartaglia, Pennica, et Goeddel 1993; Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998).

B) Présentation

1. Caractéristiques

TNF- α et TNF- β interagissent avec leurs récepteurs, des glycoprotéines membranaires de type I qui existent sous plusieurs formes, TNF-RI (p55), TNF-RII (p75) et TNF-RIII.

TNF- α existe sous deux formes : soluble ou membranaire. Lorsque TNF- α est lié à la membrane cellulaire, c'est une protéine de 26kDa comprenant un domaine cytoplasmique, un domaine membranaire et un domaine extra-cellulaire (Gruss, 1996) et pouvant être clivé par l'enzyme de conversion de TNF α (TACE). Lorsque la TACE le clive, TNF- α devient soluble et pèse seulement 17kDa (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998). La structure de TNF- α est présentée Figure 5.

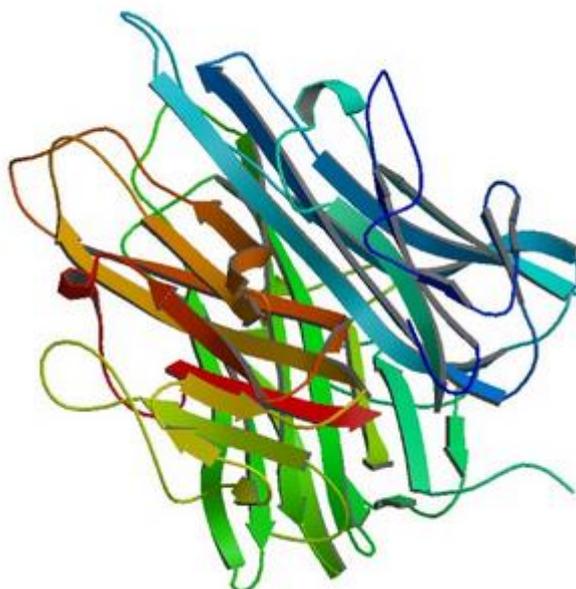


Figure 5 : structure du TNF- α - issu du site rcsb.org

2. Mode d'action

Le TNF est produit principalement par les cellules de la lignée des monocytes/macrophages mais aussi par les neutrophiles, les cellules T CD4+ et CD8+, les cellules épithéliales, les mastocytes, les cellules dendritiques et les ostéoblastes (Frankenberger et al. 1996).

Cette synthèse répond à des stimuli variés pouvant être de nature biologique, chimique ou physique, comme par exemple le LPS, des cytokines (IL-2, GM-CSF ou TNF- α lui-même), des virus, un trauma ou une ischémie.

Comme expliqué par la Figure 6, le TNF- α membranaire est produit sous l'action d'un stimulus comme le LPS et clivé par l'enzyme de conversion du TNF- α . Le produit clivé s'associe en homotrimère et est circulant ; cet homotrimère possède alors trois sites de liaison au récepteur.

Les récepteurs au TNF- α :

- ✓ Les récepteurs au TNF- α sont situés sur toutes les cellules sauf les érythrocytes. Ils présentent des spécificités de tissu, l'un étant souvent majoritaire par rapport à l'autre (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998).
- ✓ Chaque récepteur a des caractéristiques différentes mais les deux travaillent ensemble : TNF-RII possède une très forte affinité pour TNF- α et le complexe se dissocie facilement, alors que TNF-RI a une cinétique de dissociation très lente donc la liaison de TNF- α à TNF-RI est presque irréversible.
- ✓ Il semblerait que lorsque TNF- α est en faible concentration, TNF-RII fixe TNF- α (forte affinité du récepteur pour sa molécule cible) et facilite la fixation de TNF- α sur TNF-RI en augmentant la concentration en TNF- α à la surface de la cellule (Tartaglia, Pennica, et Goeddel 1993; Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998). Ce phénomène, appelé « ligand passing », est illustré par la Figure 6.

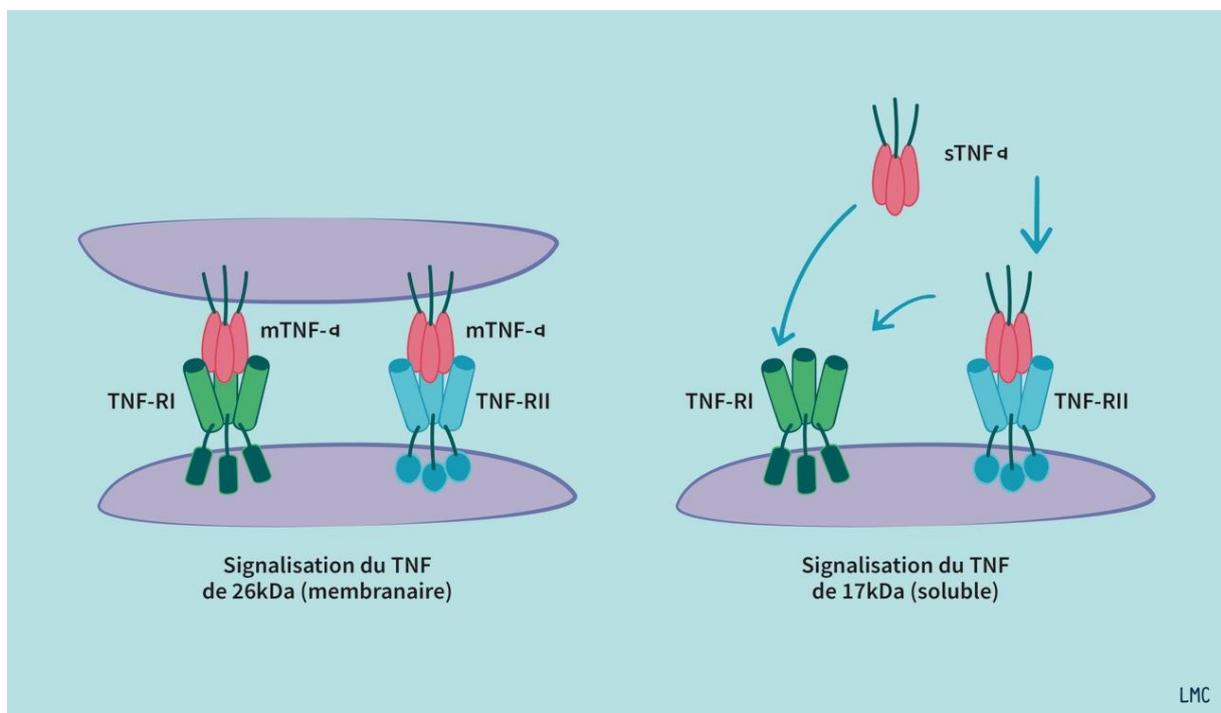


Figure 6 : illustration du phénomène de "ligand passing" – adapté par LMC de (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998)

Lorsque TNF- α se lie au récepteur, le domaine cytoplasmique de TNF-RI réagit alors en se liant avec la protéine d'interaction avec le récepteur (RIP), qui est une des molécules entrant dans l'initiation de l'apoptose et forme un complexe avec elle. Cette liaison se fait au niveau d'une séquence commune à plusieurs protéines reliées à l'apoptose appelée « death-domain ». La Figure 7 présente la cascade d'événements aboutissant à la liaison de TNF- α sur ses récepteurs et ce qui en découle.

- *Si TNF-RI/RIP recrute la protéine TRADD (TNF-RI-associated death-domain protein), la caspase-8 est activée et le phénomène apoptotique se met en marche.*
- *Si TNF-RI/RIP recrute TRAF-2 (TNF-R-associated factor 2), c'est la réaction inflammatoire qui est médiée via le NF- κ -B, ce dernier protégeant alors la cellule de l'apoptose en cas de forte inflammation (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998).*
- *Si TNF-RII recrute TRAF-2, c'est aussi la réaction inflammatoire qui est médiée. Néanmoins, ces deux voies ne sont pas catégoriquement indépendantes et il apparaîtrait que TRAF-2 peut aussi induire l'apoptose en se liant à TNF-RII. En effet, dans les lymphocytes T, c'est la concentration intracellulaire en RIP qui détermine quelle voie de signalisation est induite par TNF-RII et si NF- κ -B est activé plutôt que les caspases (Pimentel-Muiños et Seed 1999). Une forte concentration en RIP activera la voie des caspases et l'apoptose (non représenté dans la Figure 7).*

En conclusion, on peut catégoriser les choses en disant que :

- TNF-RI est impliqué dans l'apoptose,
- TNF-RII est impliqué dans la voie pro-inflammatoire activant le NF- κ -B,
- mais la protéine régissant l'apoptose est RIP, qui a le pouvoir de changer les signaux donnés par TNF-RI et -RII.

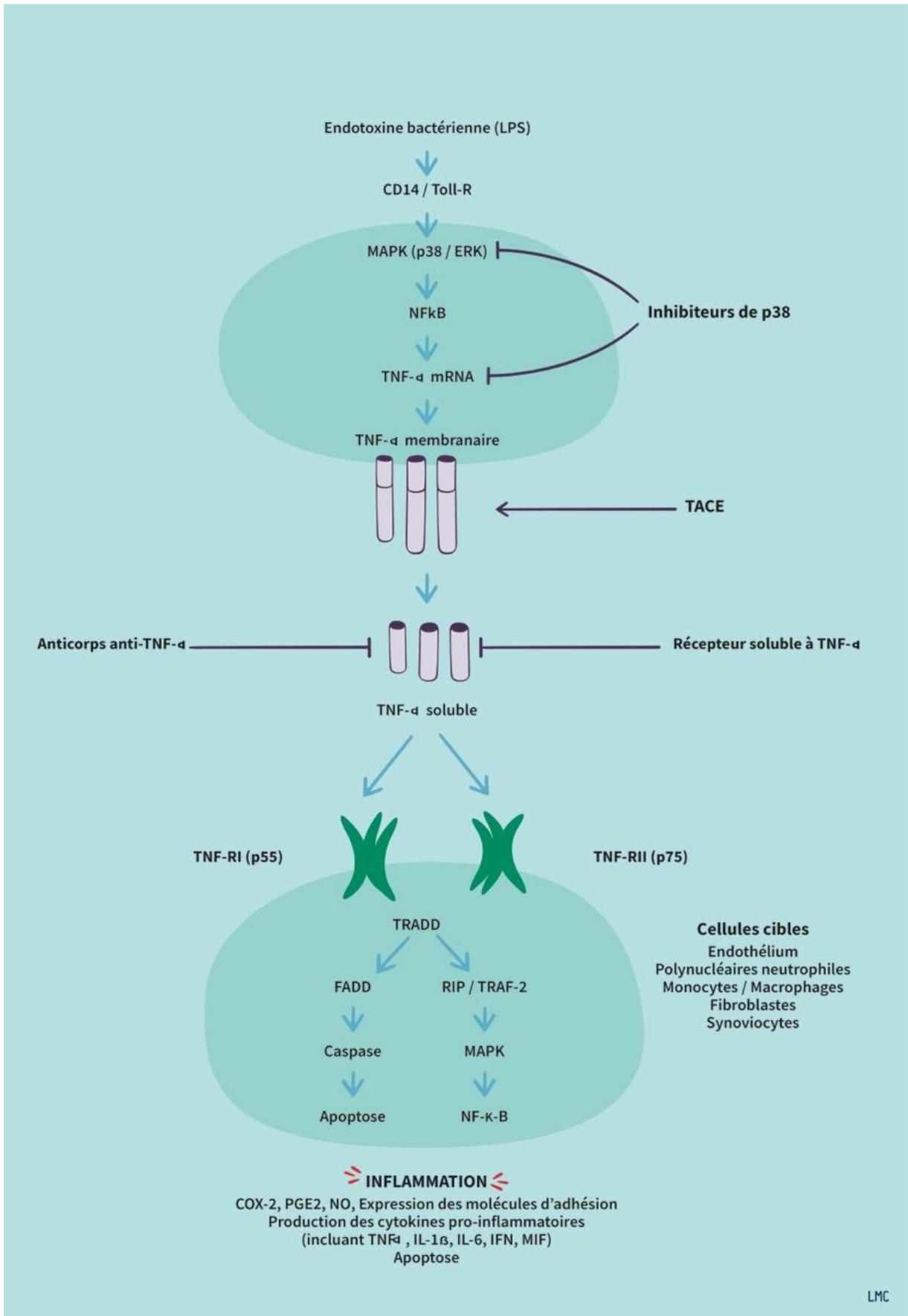


Figure 7 : schéma de production de TNF-α lors d'inflammation – adapté par LMC de (Baugh et Bucala 2001)

Le promoteur du gène de TNF- α contient des sites de liaison avec NF- κ -B, AP-1, NFILK-6 et NFAT – ces molécules pouvant alors activer la transcription de TNF- α – mais il apparaît que NF- κ -B est indispensable à la synthèse de TNF- α (Shakhov et al. 1990).

Il existe une voie de régulation de TNF- α par IL-10 : TNF- α induit la synthèse d'IL-10 lorsqu'il est produit or IL-10 agit directement sur TNF- α dans une boucle de rétrocontrôle négatif pour diminuer sa production. Il s'agirait d'une façon d'éviter que le système s'emballe tout en permettant à l'organisme de répondre à une inflammation via le TNF- α (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998).

TNF- α joue un rôle très important dans la décision d'être pro- ou anti-inflammatoire, mais ce n'est pas son seul rôle.

C) Autres rôles joués par TNF- α

1. Protection par des anticorps anti-TNF- α

TNF- α est impliqué dans de nombreuses maladies inflammatoires et la recherche s'est tournée récemment vers la neutralisation du TNF via des anticorps pour réduire ses effets pro-inflammatoires délétères (notamment dans l'arthrite rhumatoïde, la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn).

TNF- α joue aussi un rôle important lors de chocs septiques mais les efforts pour contrer ses effets pro-inflammatoires sont diminués par le fait que les substances anti-TNF- α ont souvent des effets immunodépresseurs (Baugh et Bucala 2001).

2. Métabolisme adipeux et glucidique

TNF- α est mis en cause dans la pathogénie de l'insulino-résistance. Cette insulino-résistance intervient surtout dans deux maladies : l'obésité et le diabète.

L'expression de TNF- α est augmentée dans les adipocytes de souris obèses. De plus, on induit une résistance à l'insuline en injectant du TNF- α à des souris. Il apparaît que lorsque la concentration en TNF- α est élevée, l'activité du récepteur tyrosine-kinase à l'insuline est diminuée et l'insulin receptor substrate 1 (IRS-1, second messenger) n'est pas phosphorylé. Ces actions sont médiées par TNF-RI (p55) (Peraldi et Spiegelman 1998). La Figure 8 résume les différents mécanismes en jeu lors d'obésité.

Il a de plus été montré que les adipocytes les plus gros sécrètent TNF- α et entretiennent l'inflammation (Skurk et al. 2007).

De très fortes concentrations en TNF- α et IL-6 ont été mesurées chez les patients atteints de diabète de type 2 (Febbraio et Pedersen 2002; Adam Steensberg et al. 2003), laissant supposer que ces deux cytokines sont impliquées dans le métabolisme glucidique.

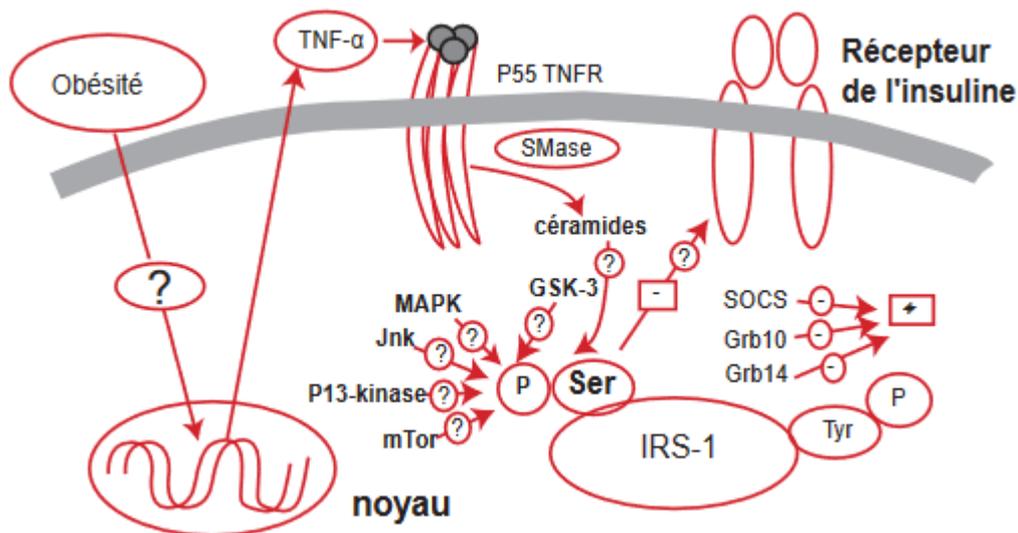


Figure 8 : mécanismes moléculaires de l'effet du TNF- α sur la voie de signalisation de l'insuline - issu de (Peraldi et Spiegelman 1998)

Le syndrome métabolique équin est de plus en plus diagnostiqué aujourd'hui, la piste du TNF- α apportera peut-être un médicament dans les années à venir. Une piste déjà explorée est celle des chaperonines chimiques qui ont montré leur utilité dans la restauration de la sensibilité à l'insuline (Ozcan et al. 2006).

III) Les interleukines 6, une grande famille, focus sur IL-6

A) Rôle des interleukines 6

La famille des interleukines 6 regroupe des protéines partageant une structure hélicoïdale et la sous-unité gp130 (récepteur tyrosine kinase). Il s'agit de IL-6, IL-11, le leukemia inhibitory factor (LIF), l'oncostatine M (OSM), le ciliary neurotrophic factor (CNTF), la cardiotropine-1 (CT-1), le cardiotrophin-like related cytokine and stimulating neurotrophin-1/B-cell stimulating factor (NNT-1), la neuropoïétine (NPN), IL-27 et IL-31.

Seule IL-31 ne partage pas gp130 avec les autres membres de cette famille. Gp130 possède six domaines extracellulaires, un domaine trans-membranaire et un domaine cytoplasmique (Scheller et al. 2011).

Cette famille de cytokines possède des rôles importants dans plusieurs processus biologiques comme l'hématopoïèse, la réponse immunitaire ou l'inflammation. La réponse induite par ces stimuli consiste en la production de différentes molécules jouant un rôle crucial dans le contrôle de l'inflammation et de l'homéostasie (Gadient et Otten 1997).

B) Présentation de IL-6

1. Caractéristiques

L'interleukine 6 est une protéine pesant entre 22 et 27kDa en fonction de son état de glycosylation et composée de quatre longues hélices α antiparallèles (Gadient et Otten 1997).

IL-6 possède trois sites de liaison comme présenté dans la Figure 9 :

- ✓ le site 1 est le site de liaison au récepteur de IL-6 (appelé IL-6R)
- ✓ le site 2 est le site de liaison à gp130 entre ses domaines 2 et 3
- ✓ le site 3 est le site de liaison à gp130 sur son domaine 1

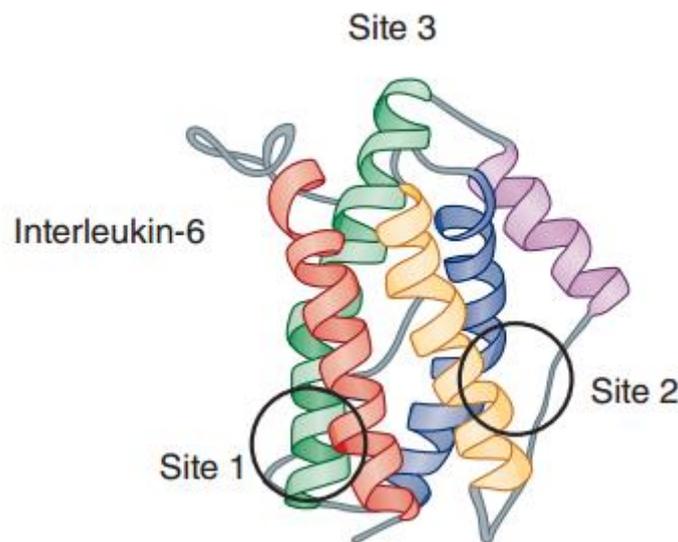


Figure 9 : structure tridimensionnelle de l'interleukine 6 - adapté d'après (Hunter et Jones 2015)

IL-6 est produite par des cellules variées, monocytes activés, macrophages, cellules endothéliales, cellules musculaires ou adipocytes de façon à garder une concentration basale en IL-6 ou après des stimuli comme une infection (augmentation de TNF- α ou d'IL-6, endotoxines bactériennes), un cancer ou une hypoxie (Hunter et Jones 2015). Néanmoins, il n'a pas encore été déterminé avec précision si toutes ces cellules produisent le même IL-6 ou des isoformes différentes ; de même, il existe plusieurs isoformes de gp130 (Richards et al. 2006).

IL-6 induit la différenciation des lymphocytes B et T, est impliquée dans le métabolisme osseux, lipidique et glucidique et a des effets sur les systèmes nerveux et vasculaire (Gadient et Otten 1997; Hunter et Jones 2015).

C'est une cytokine aux effets pro- et anti-inflammatoires extrêmement impliquée dans l'immunité innée et adaptative, dont IL-1 β et TNF- α sont les activateurs les plus importants. Le choix d'un effet pro- ou anti-inflammatoire est fonction du contexte. IL-6 est capable d'inhiber l'expression de TNF- α (et donc d'inhiber l'activation du NF- κ -B) et de IL-1, et d'activer IL1-ra (récepteur antagoniste de IL-1 qui diminue ses effets en bloquant ses récepteurs et empêche sa transcription). Ses effets pro-inflammatoires sont néanmoins importants et IL-6 est impliquée dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques comme l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Castleman (Richards et al. 2006; Nishimoto et al. 2000).

Une déficience comme une surexpression de cette molécule aboutit à des effets délétères pour l'organisme car IL-6 est très impliquée dans les différents schémas de l'inflammation (entre autres le recrutement de neutrophiles, de monocytes et leur apoptose) (Jones 2005) et a des actions à plusieurs niveaux de l'organisme. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont basées sur l'apport d'IL-6 ou de l'anticorps anti-IL-6 – le tocilizumab par exemple – en fonction de l'effet recherché (Cabrera et al. 2016).

2. Mode d'action

IL-6 se lie à son récepteur IL-6R à la surface de la cellule cible, ce qui provoque la dimérisation de gp130 et le recrutement des Janus kinases (JAK) cytoplasmiques par gp130 ; il semblerait que de faibles concentrations en IL-6 aboutissent à la formation d'un complexe tétramérique constitué de IL-6, IL-6R et gp130 alors que de fortes concentrations aboutissent à la formation d'un complexe hexamérique avec IL-6, IL-6R et gp130.

Ces kinases phosphorylent un *signal transducer and activator of transcription* (STAT1, STAT3 ou STAT5) (Heinrich et al. 2003), qui se dimérise et active la transcription de différents gènes en se translocant dans le noyau. La dimérisation de gp130 provoque également l'activation de la kinase PI-3 et de la cascade des kinases MAP via la protéine Ras (Gadient et Otten 1997; Hunter et Jones 2015). La Figure 10 résume ce mécanisme.

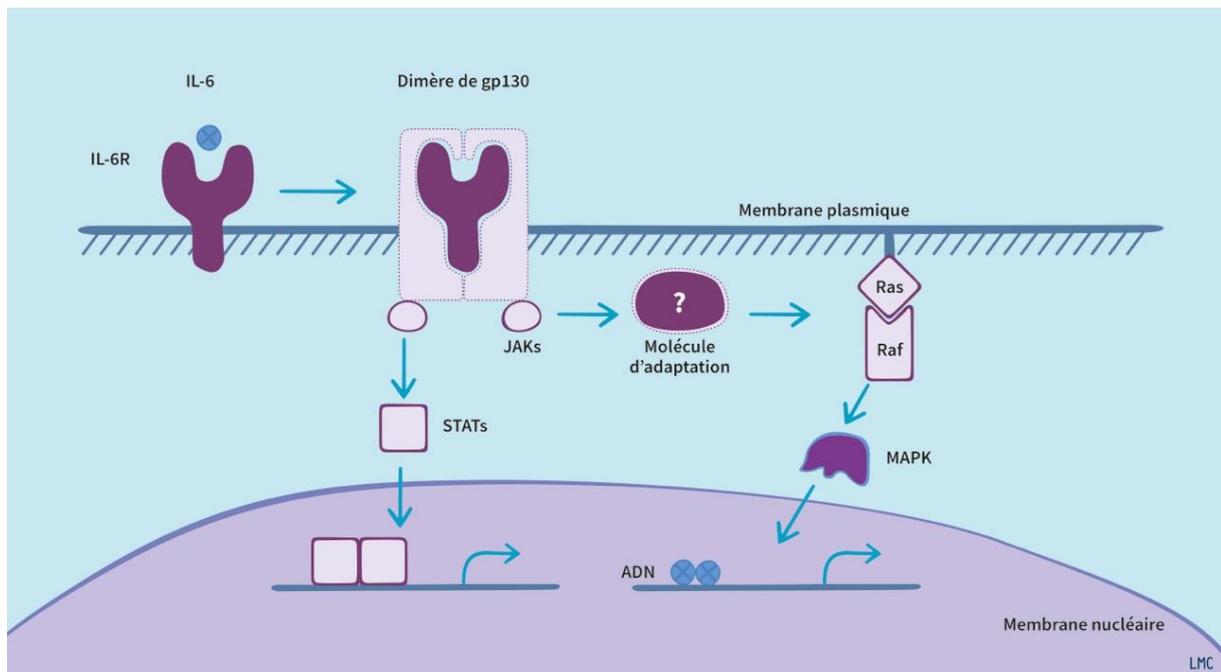


Figure 10 : mode d'action de l'interleukine 6 – adapté par LMC de (Gadient et Otten 1997)

Néanmoins, si cette voie est la voie classique de la signalisation d'IL-6, IL-6R n'est présent que sur certaines cellules (macrophages, neutrophiles, hépatocytes entre autre) (Scheller et Rose-John 2006) alors que toutes les cellules de l'organisme possèdent gp130. Il existe une forme soluble du récepteur (sIL-6R) qui agira dans certains cas et lorsque la cellule ne possède pas de récepteur membranaire. On appelle cette voie de signalisation le « *trans-signaling* ». Les deux formes de signalisation sont présentées dans la Figure 11.

Les formes solubles du récepteur sont très souvent en compétition avec les formes ancrées dans la membrane et donc antagonistes. De même, il existe une forme soluble de gp130 (sgp130), qui n'a aucun effet sur la forme membranaire de IL-6R (Hunter et Jones 2015).

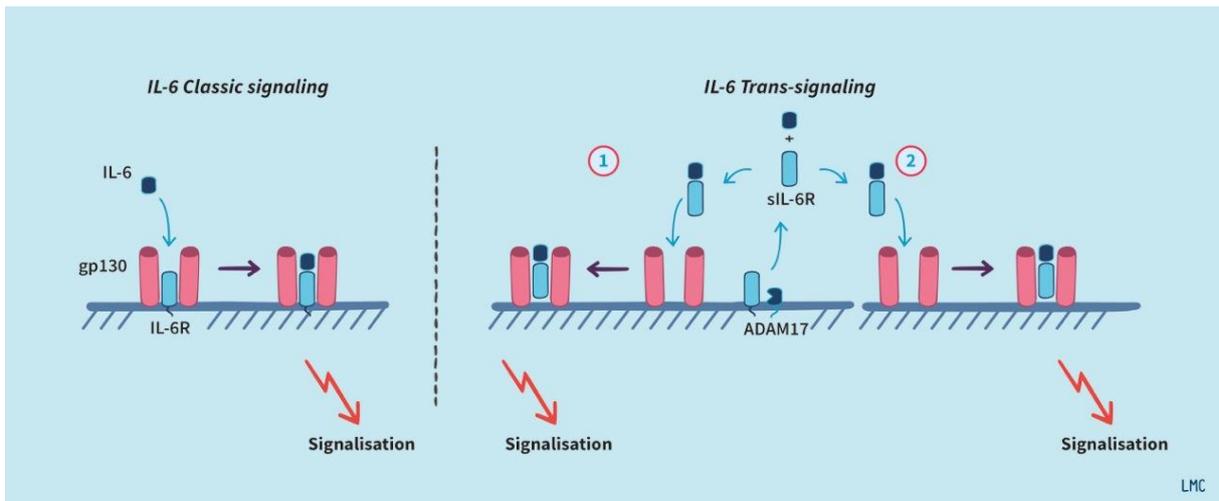


Figure 11 : illustration de deux formes de signalisation de l'interleukine 6 – adapté par LMC de (Scheller et al. 2011)

La Figure 12 présente un exemple du mode d'action des deux types de récepteurs (membranaire et soluble) en cas de réaction inflammatoire (Scheller et al. 2011) :

- ✓ Attraction des neutrophiles par les chémokines et IL-6 sur le site d'entrée des micro-organismes
- ✓ Les neutrophiles produisent sIL-6R par clivage protéolytique de leur propre récepteur membranaire
- ✓ Le *trans-signaling* via IL-6 et le sIL-6R aboutit à l'attraction de monocytes et de lymphocytes T
- ✓ Parallèlement au *trans-signaling*, IL-6 induit l'apoptose des neutrophiles ayant perdu leur IL-6R

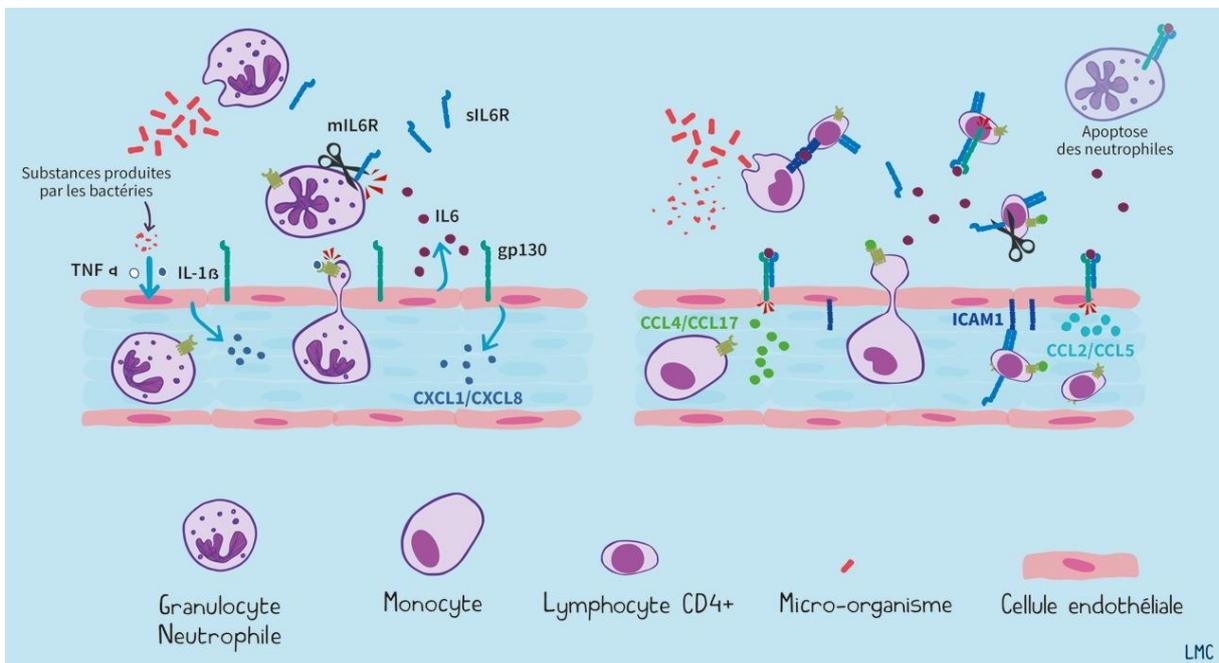


Figure 12 : mode d'action des récepteurs à IL-6 en cas de réaction inflammatoire – adapté par LMC de (Scheller et al. 2011)

C) Autres rôles joués par IL-6

1. Cytokine pléiotropique dans le système immunitaire

IL-6 aide les lymphocytes B et T à se différencier au début de leur développement. Elle stimule la production d'anticorps via les lymphocytes B et peut favoriser la différenciation des lymphocytes T en Th17 plutôt qu'en Treg grâce au *trans-signaling* (Scheller et al. 2011).

Comme vu ci-dessus dans la partie III) B) 2, l'action protéolytique des neutrophiles sur leur propre IL-6R conduit à l'apparition de *trans-signaling* dans les tissus inflammés et à un changement dans le recrutement des cellules inflammatoires (des monocytes plutôt que des neutrophiles). Cette apoptose des neutrophiles induite par IL-6 aboutit à une diminution de l'infiltration neutrophilique lors de la phase aiguë de l'inflammation.

De plus, IL-6 agit sur la migration des leucocytes et la différenciation des monocytes en macrophages.

2. Impacts variés et importants dans le métabolisme

2.i – Osseux

L'homéostasie osseuse est régulée par la balance entre les ostéoblastes et les ostéoclastes. Il a été montré que la formation d'ostéoclastes est médiée par IL-6 en présence de sIL-6R (Tamura et al. 1993).

2.ii – Hépatique

IL-6 joue un rôle dans le métabolisme hépatique et dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (médié par IL-6R) (Febbraio, Rose-John, et Pedersen 2010; Peraldi et Spiegelman 1998).

2.iii – Adipeux

L'obésité est un état inflammatoire chronique, il a été montré que les adipocytes trop gros sécrétaient IL-6 (Skurk et al. 2007), ces découvertes sont liées à celles de Peraldi et Febbraio sur l'insulino-résistance (Febbraio, Rose-John, et Pedersen 2010; Peraldi et Spiegelman 1998).

2.iv – Nerveux

IL-6 intervient dans la différenciation des cellules nerveuses initiée par le nerve growth factor (NGF) et régule les canaux à sodium voltage-dépendants.

Au niveau des cellules nerveuses, neurones, astrocytes ou cellules microgliales – macrophages résidents du système nerveux – la production d'IL-6 répond à différents stimuli, entre autres TNF- α et IL-1 β , mais aussi le LPS ou d'autres antigènes viraux ou bactériens. IL-6 protège ces cellules contre différents stress incluant l'excitotoxicité (au NMDA), l'ischémie ou les dommages cérébraux (l'augmentation locale d'IL-6 accélère la régénération) (Gadient et Otten 1997).

2.v – Tumoral

IL-6 contribue, tout comme les HSP, à la survie de certaines tumeurs malignes comme le plasmocytome ou le lymphome à cellules B. C'est un facteur de croissance et de malignité : les tumeurs avec les plus hauts grades de malignité expriment de très fortes concentrations en IL-6 (Li, Grivennikov, et Karin 2011; Gadiant et Otten 1997)

2.vi – Glucidique

IL-6 entre aussi en jeu lors de résistance à l'insuline (Febbraio, Rose-John, et Pedersen 2010; Adam Steensberg et al. 2003) mais plus généralement lors de besoin en glucose (action sur les récepteurs GLUT-4).

Pedersen a fait l'hypothèse que IL-6 est relargué par le muscle lorsque les réserves en glycogène sont basses, comme signal au foie pour augmenter la néoglucogenèse (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001).

IL-6 et maladies dégénératives :

- ✓ IL-6 paraît être fortement lié à la maladie d'Alzheimer mais les chercheurs ne savent pas encore si la cytokine est la cause des désordres dégénératifs ou si sa présence ne fait que refléter l'état inflammatoire induit par les dommages créés par la maladie.
- ✓ Dans le cas de la maladie de Parkinson, les patients atteints montrent des concentrations en IL-6 dans leur fluide cérébrospinal supérieures à celles des patients sains (Gadiant et Otten 1997).

3. Rôle d'IL-6 dans la douleur

IL-6 joue un rôle dans la signalisation de la douleur, en effet, les souris déplétées en IL-6 ne développent pas d'hyperalgésie thermique et une forte concentration en IL-6 est capable d'induire la production de substance P par les neurones sympathiques (Gadiant et Otten 1997; Murphy et al. 1999).

Les trois biomarqueurs suivis dans l'étude expérimentale ayant été présentés, l'intérêt se portera désormais vers un des facteurs biologiques capable de les recruter : l'action du stress oxydant sur les cellules et plus particulièrement en cas d'exercice physique.

IV) Le stress oxydant chez le cheval athlète

Le cheval athlète possède un organisme formidable lui permettant d'accomplir des efforts intenses. Son système cardiovasculaire a une importante réserve – la fréquence cardiaque au repos est augmentée jusqu'à plus de 10 fois à l'exercice – et la capacité de la rate à relarguer des globules rouges dans la circulation sanguine lui confère une réserve de transport d'oxygène supplémentaire lors d'exercices intenses. De plus, le cheval possède une masse musculaire très importante comparée à son poids (Kinnunen 2011). La comparaison de valeurs physiologiques chez le cheval et l'homme est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : comparaison de quelques valeurs physiologiques chez l'Homme et le cheval de course, au repos et à l'effort - adapté d'après (Hodgson, McKeever, et McGowan 2014)

	Athlète humain	Thoroughbred
VO ₂ max (mL O ₂ /kg/min)	69-85	160
FC au repos (bpm)	40-60	20-30
FC à l'effort maximal (bpm)	190	240
Indice systolique au repos (mL/kg)	1,1-1,4	1,3-2,3
Indice systolique à l'effort maximal (mL/kg)	1,5	2,5-2,7
Hématocrite au repos (%)	40-50	32-46
Hématocrite à l'effort maximal (%)	40-50	60-70
Pic de lactate (mmol/L)	15	30

A) Le stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre en faveur de la production de molécules pro-oxydantes et en défaveur des systèmes de défense antioxydants.

Ce stress est causé par des radicaux libres qui sont produits lors de réactions d'oxydo-réduction. Ces radicaux possèdent un électron célibataire et sont très peu stables.

Une des principales molécules responsable du stress oxydant est l'oxygène. Sa structure atomique en fait une molécule oxydante capable de produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ce terme inclut à la fois des radicaux libres issus de l'atome d'oxygène mais aussi des espèces non radicalaires oxydantes contenant un ou des atomes d'oxygène.

Il faut savoir que l'azote, le chlore et le brome sont aussi fournisseurs d'espèces réactives oxydantes (Dubois et al. 2015; Halliwell et Gutteridge 2015). Une liste des différentes espèces réactives issues de l'oxygène, de l'azote, du brome et du chlore est présentée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : nomenclature des différentes espèces réactives - issu de Dubois, 2015, adapté d'après (Halliwell et Gutteridge 2015)

	Radicaux libres	Non-radicaux
Espèces réactives de l'oxygène	Anion superoxyde, O ₂ ^{°-}	Peroxyde d'hydrogène, H ₂ O ₂
	Radical hydroxyle, HO [°]	Acide hypobromeux, HOBr
	Radical hydroperoxyl, HO ₂ [°]	Acide hypochloreux, HOCl
	Anion carbonate, CO ₃ ^{°-}	Ozone, O ₃
	Radical peroxy, RO ₂ [°]	Oxygène singulet, ¹ O ₂
	Radical alkoxy, RO [°]	Peroxyde organique, ROOH
	Dioxyde de carbone, CO ₂ ^{°-}	Anion peroxydinitrite, ONOO ⁻
	Anion oxygène singulet, O ₂ ⁻	Acide peroxydinitrique, ONOOH
		Anion peroxydinitrate, O ₂ NOO ⁻

Espèces réactives de l'azote	Monoxyde d'azote, NO° Dioxyde d'azote, NO_2° Radical nitrate, NO_3°	Anion nitrosoperoxycarbonate, ONOCOO_2^- Anion peroxomonocarbonate, HOOCO_2^- Acide nitreux, HNO_2 Cation nitrosyl, NO^+ Anion nitroxyl, NO^- Tetroxyde dinitreux, N_2O_4 Trioxyde dinitreux, N_2O_3 Anion peroxydinitrite, ONOO^- Acide peroxydinitrique, ONOOH Anion peroxydinitrate, O_2NOO^- Cation nitrile, NO_2^+ Alkyl-peroxydinitrites, ROONO Alkyl-peroxydinitrates, RO_2ONO Chlorure de nitrile, NO_2Cl Peroxyacétyl nitrate, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$ Acide hypochloreux, HOCl Chlorure de nitrile, NO_2Cl Chloramines, R-NHCl Dichlore, Cl_2 Chlorure de brome, BrCl Dioxyde de chlore, ClO_2 Acide hypobromeux, HOBr Dibrome, Br_2 Chlorure de brome, BrCl
Espèces réactives du chlore	Chlore atomique, Cl°	
Espèces réactives du brome	Brome atomique, Br°	

Dans les conditions physiologiques, chez le cheval au repos, 2% de l'oxygène inspiré n'est pas transformé en eau mais en ERO (les différentes réactions permettant de les produire sont présentées ci-dessous), et lors d'un exercice le cheval augmente jusqu'à 40 fois sa consommation d'oxygène (Kirschvink 2013). Il s'agit alors d'une source abondante d'ERO provoquant un stress oxydant certain pour les cellules, à l'entraînement comme en concours ou en course.

Les ERO peuvent provenir de plusieurs réactions endogènes :

× **La chaîne de transfert des électrons**

Dans les mitochondries, l'oxygène est converti en ATP. Une partie de cet oxygène forme des ERO en grande partie via le coenzyme Q (Alcaraz, Gualillo, et Sanchez-Pernaute 2013; De Moffarts et al. 2005). Cette réaction de transfert des électrons est présentée dans la Figure 13.

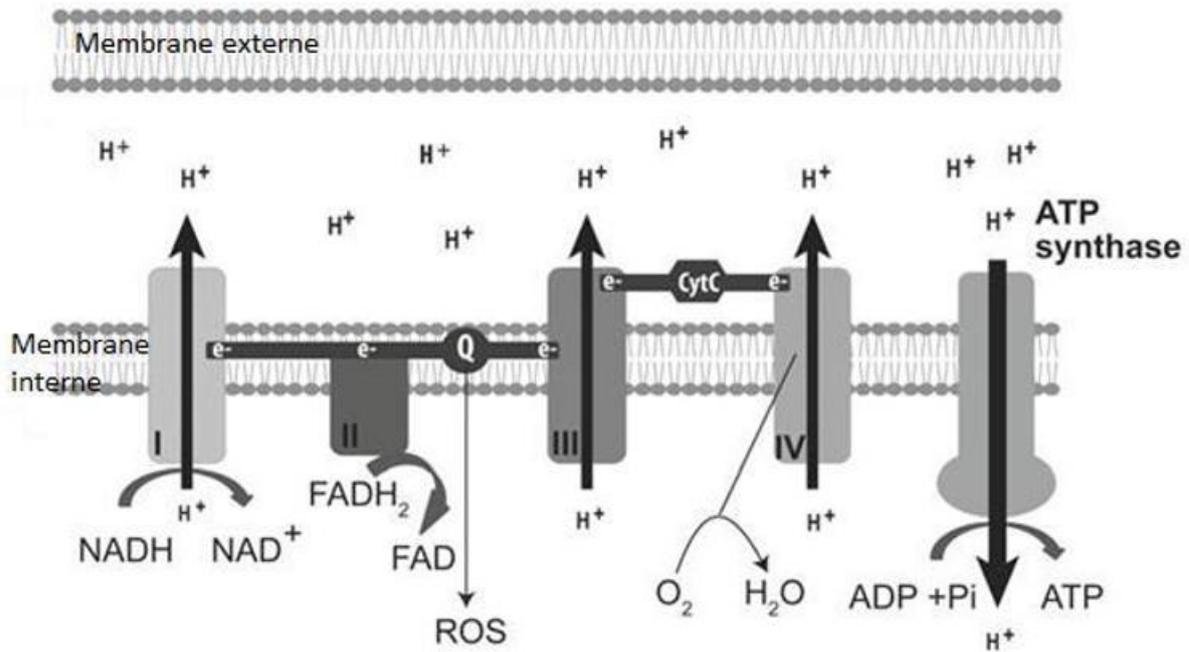


Figure 13 : chaîne de respiration mitochondriale ou de phosphorylation oxydative - issu de (Dubois et al. 2015), adapté d'après (Alcaraz, Gualillo, et Sanchez-Pernaute 2013)

× **Les réactions métaboliques des oxydases**

Ces réactions s'accroissent lorsqu'il y a une inflammation (la NADPH-oxydase et la myéloperoxydase sont activées spécifiquement dans ce cas) Par exemple, les oxydases des peroxysomes produisent H_2O_2 selon la réaction suivante : $R-H_2 + O_2 = R + H_2O_2$ (Halliwell et Gutteridge 2015; Marini et Veicsteinas 2010; De Moffarts et al. 2005).

× **Le « respiratory burst »**

Aussi appelé « flambée respiratoire », c'est un des systèmes de défense des cellules phagocytaires contre les pathogènes. Plusieurs enzymes sont activées comme la NADPH-oxydase 2 ou la myéloperoxydase en réponse à une « attaque » bactérienne ou virale.

Ces enzymes produisent des radicaux libres toxiques qui, mis en contact avec l'intrus, entraînent sa mort. Cette réaction très efficace reste néanmoins toxique pour la cellule (De Moffarts et al. 2005). La Figure 14 illustre ce mécanisme.

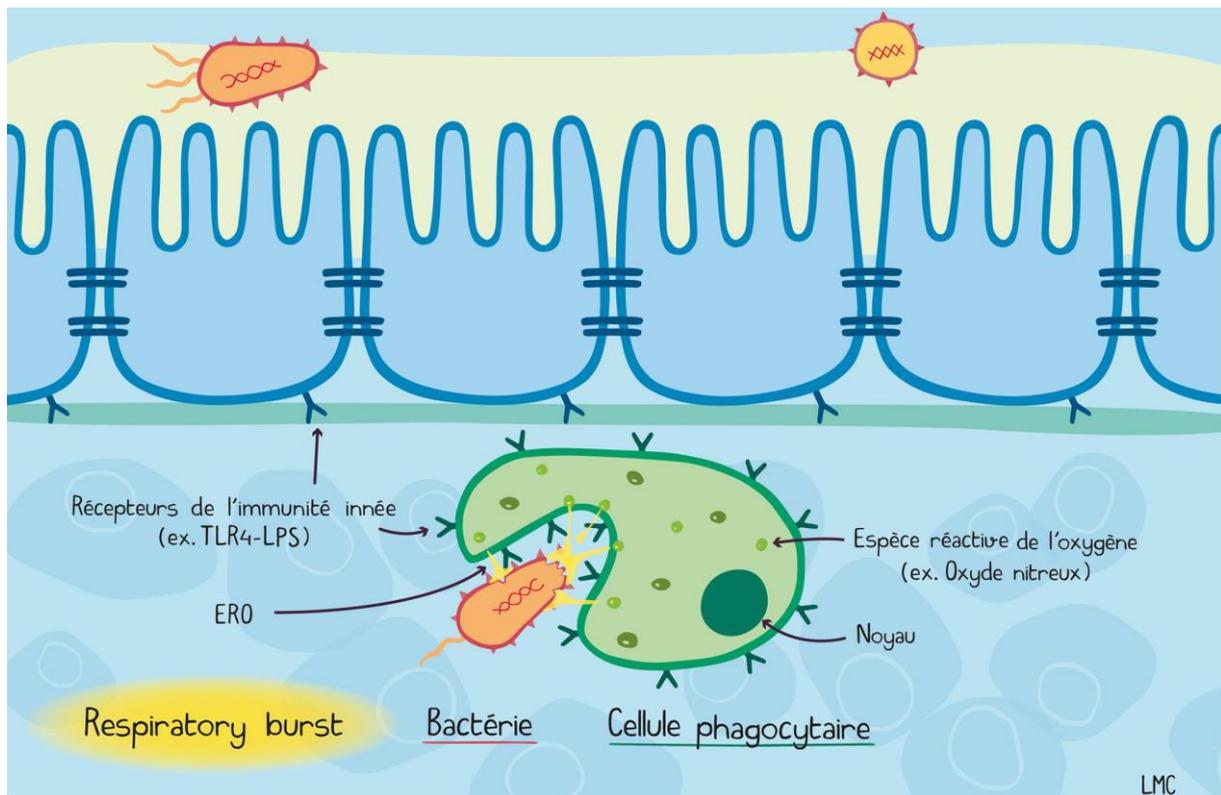


Figure 14 : mécanisme du "respiratory burst" ou flambée respiratoire des phagocytes – adapté d'après (Moquet 2016)

Des ERO peuvent aussi être formés par des réactions exogènes, à cause de pesticides ou de médicaments par exemple.

B) Défense cellulaire

Il existe différents systèmes de protection cellulaire, certains enzymatiques et d'autres non, certains oeuvrant directement contre le stress oxydant et d'autres plus généraux.

On qualifie d'antioxydant une substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport au substrat environnant pouvant être oxydé, retarde ou empêche de façon significative l'oxydation de ce même substrat (Halliwell et Gutteridge 2015).

Plusieurs enzymes sont capables de lutter directement contre le stress oxydant, comme la glutathion peroxydase (GPX), la catalase (CAT) ou la superoxyde dismutase (SOD). D'autres entités ralentissent la formation de radicaux libres, comme les protéines découplantes mitochondriales ou les chélateurs de métaux de transition.

Il existe également des antioxydants non enzymatiques, à savoir l' α -tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes (vitamine A), l'ubiquinol, les flavonoïdes, l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion, l'acide urique, les HSP ou p53 (Kirschvink 2013). Chacune de ces molécules a un mode d'action différent, allant de la dégradation à la place d'autres entités plus importantes – c'est le cas des vitamines C, E et du glutathion – à la reformation de protéines abîmées, pour les HSP.

Une liste des différents anti-oxydants et de leurs catalyseurs est présentée dans le Tableau 7.

Tableau 7 : aperçu des moyens antioxydants possédés par la cellule - issu de (Kirschvink 2013)

Marqueurs	Type	Rôles	Observations
Acide ascorbique (vitamine C)	Antioxydant hydrophile	Essentiellement plasmatique En première ligne contre les ERO	Vitamine la plus sensible
Glutathion réduit (GSH)	Antioxydant hydrophile	Essentiellement cytoplasmique Protège les protéines contre les ERO	Diminue durant l'exercice et la maladie
Glutathion oxydé (GSSG)	Marqueur oxydant	Forme oxydée du glutathion Marqueur précis du processus oxydatif	Augmente durant l'exercice et la maladie
Capacité antioxydante hydrophile du plasma (CAHP)	Marqueur antioxydant	Marqueur de la capacité du plasma à réagir contre les ERO (partie hydrophile)	Corrélée avec la vitamine C
Capacité antioxydante lipophile du plasma (CALP)	Marqueur antioxydant	Marqueur de la capacité du plasma à réagir contre les ERO (partie lipophile)	Corrélée avec la vitamine E et le β -carotène
α -tocophérol (vitamine E)	Antioxydant lipophile	Protège les lipides contre les ERO	Diminue durant des exercices répétés
β -carotène	Antioxydant lipophile	Pro-vitamine A Protège contre l'oxygène atomique	
Sélénium (Se)	Oligo-élément	Catalyseur pour la GPx	Déficiences en Se et Vit E associées à la myopathie
Cuivre (Cu)	Oligo-élément	Catalyseur pour la SOD	
Zinc (Zn)	Oligo-élément	Catalyseur pour la SOD	
Manganèse (Mn)	Oligo-élément	Catalyseur pour la SOD	
Superoxyde dismutase (SOD)	Antioxydant enzymatique	Enzyme protégeant contre l'anion superoxyde	S'améliore avec l'entraînement
Glutathion peroxydase (GPx)	Antioxydant enzymatique	Enzyme régénérant le glutathion	Corrélée avec Se S'améliore avec l'entraînement Diminue en cas de surentraînement

Peroxyde lipidique (Pool)	Marqueur oxydant	Suivi des dégâts occasionnés par l'oxydation des lipides	Corrélée négativement avec la vitamine E Faible chez les chevaux performants
Protéines oxydées (Protox)	Marqueur oxydant	Suivi des dégâts occasionnés par l'oxydation des protéines	Augmente avec l'exercice et la maladie

Il apparaît que le muscle s'adapte à un environnement riche en substances oxydantes en activant la production d'enzymes antioxydantes et de protéines chaperons. Il a été montré que lorsque le muscle est stimulé, la production de SOD et de CAT est augmentée et que la concentration en Hsp60 et 70 croît (McArdle et al. 2001). Le muscle s'adapte aussi à un environnement riche en anti-oxydants (lorsque le cheval est supplémenté). Khassaf et al ont ainsi montré qu'une supplémentation en vitamine C diminue la réponse adaptative (qui se fait via Hsp70 entre autres) mais augmente le taux basal de certains antioxydants comme les HSP, CAT et SOD (Khassaf et al. 2003). Fischer et al ont montré qu'une supplémentation en vitamine E diminuait la concentration d'Hsp72 circulante et d'ARNm dans le muscle (Fischer et al. 2006).

Chaque antioxydant n'agit pas sur toutes les ERO, il n'existe pas d'antioxydant universel. De même, chaque espèce d'ERO a ses propriétés chimiques et ses propres taux de réaction, et réagit préférentiellement avec certaines entités plutôt qu'avec d'autres (par exemple, OH° est peu discriminant alors que NO° est très sélectif) (Halliwell 2012).

Le « respiratory burst » est un élément important de l'immunité de l'organisme. Toute réaction inflammatoire faisant intervenir les cellules phagocytaires est protectrice de la cellule mais productrice d'ERO et peut l'endommager. Il existe un risque de toxicité balancé par le bénéfice d'être débarrassé de l'intrus.

La production d'ERO est directement liée à NF-κ-B, HSF, p53, et mène à la production de nouvelles mitochondries. La cellule musculaire peut alors produire plus d'ATP pour répondre aux demandes du muscle. Les ERO créés par l'exercice physique génèrent des cytokines inflammatoires, dont IL-6 (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001)

Le NF-κ-B, dont la production est très liée à TNF-α, active la production d'enzymes antioxydantes. La capacité antioxydante du muscle augmente l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 et diminue celle du gène pro-apoptotique Bax (Siu et al. 2004; Jolly et Morimoto 2000).

Les adaptations musculaires dues aux ERO agissent comme un préconditionnement qui protège le muscle entraîné contre les dommages causés par l'exercice physique (Kinnunen 2011).

C) Dommages créés par les ERO

Les ERO créent des dommages dans tout l'organisme et à plusieurs niveaux dans la cellule. Ils s'attaquent en premier aux lipides, puis aux protéines, enfin aux bases formant l'ADN cellulaire (De Moffarts et al. 2005).

1. Lipides

Les ERO altèrent les lipides via des peroxydations. Il y a alors baisse de la fluidité et augmentation de la perméabilité membranaire suite à la cassure des chaînes carbonées des lipides de la bicouche.

Ces modifications vont jusqu'à entraîner la rupture cellulaire car la membrane devient plus rigide (cas de l'hémolyse des hématies traversant les tissus fortement soumis au stress oxydant) ; la membrane des organites est aussi susceptible de se rompre, ce qui dans le cas des lysosomes ou des mitochondries libère des hydrolases qui attaqueront la cellule ou des caspases (pro-apoptiques).

La diminution du mouvement latéral des protéines membranaires et la rigidification de la membrane impactent le bon fonctionnement de la chaîne de phosphorylation mitochondriale, les échanges ioniques via les canaux membranaires et les mécanismes d'endo- et d'exocytose (Halliwell et Gutteridge 2015).

2. Protéines

Les ERO altèrent également les acides aminés des protéines. Tous les acides aminés ne sont pas sensibles de la même manière au stress oxydant mais *in fine* toutes les chaînes latérales peuvent être touchées (les acides aminés les plus sensibles seraient les acides aminés souffrés, basiques et aromatiques).

Les protéines peuvent être nitrosylées, oxydées, nitratées, ceci pouvant mener à la modification ou à la perte de leurs propriétés biologiques suite à un changement conformationnel (Henrotin, Bruckner, et Pujol 2003). Les enzymes seront moins efficaces après une oxydation (De Moffarts et al. 2005).

3. ADN

Du fait de la structure polyanionique de l'ADN et de la présence de nombreux métaux de transition dans sa double hélice, celui-ci est très sensible au stress oxydant. Les ERO altèrent l'ADN au niveau des bases azotées pyriques et pyrimidiques, ou de la liaison entre les bases et le désoxyribose (cassure, pontage, perte d'une base, voir Figure 15).

Les ERO ne sont pas les seules entités capables d'abimer l'ADN, les protéines qui s'accrochent à la double hélice pour lire l'ADN et le transcrire le font grâce à une attaque radicalaire (Favier 2003). Marini et Veicsteinas ont également montré que l'âge joue un rôle important quant à la capacité de l'organisme à résister aux ERO (Marini et Veicsteinas 2010).

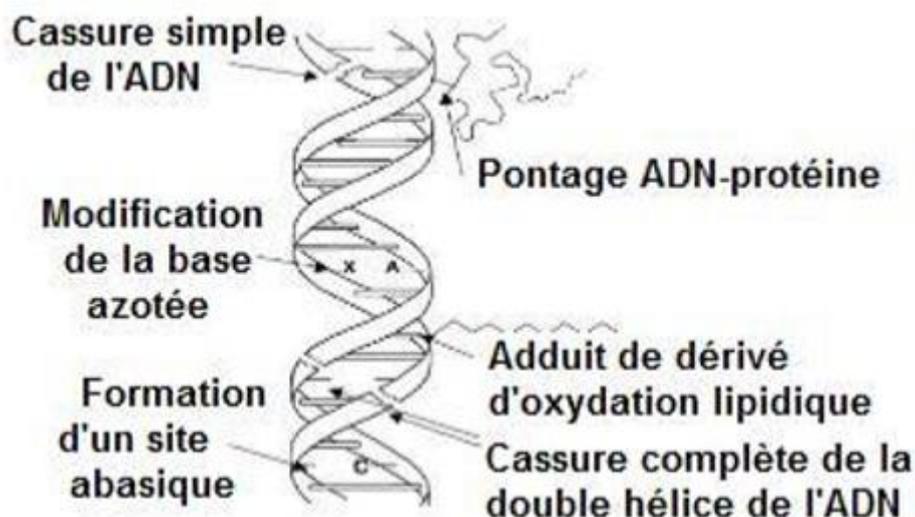


Figure 15 : altérations de l'ADN entraînées par un stress oxydant - issu de (Dubois et al. 2015) et adapté d'après Favier, 2003, Delattre, 2003 et Webb and Twedt, 2008

L'ADN mitochondrial est encore plus exposé aux attaques radicalaires car il n'est pas enroulé autour d'histones et est au plus près de la production de radicaux (formés en grande partie par la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie). L'ADN mitochondrial subit une base modifiée par les ERO toutes les 8.10^3 bases alors que l'ADN nucléaire subit une modification de base toutes les $1,3.10^5$ bases (Favier 2003). De plus, l'ADN mitochondrial ne comporte aucun intron et chaque mutation est susceptible d'avoir de plus fortes conséquences sur la transcription future des gènes (Halliwell et Gutteridge 2015).

Les dommages créés par les ERO se surajoutent au déséquilibre ambiant favorisant le stress oxydant dans les cellules qui produisent alors encore plus d'ERO, c'est un cercle vicieux. Néanmoins, un léger niveau de stress oxydant semble favoriser la réponse cellulaire à un stress plus élevé en préparant la cellule et ses défenses antioxydantes (Marini et Veicsteinas 2010).

D) Evaluation du stress oxydant

1. Comment évaluer le stress oxydant

L'évaluation du stress oxydant peut se faire théoriquement par la mesure des radicaux libres, des antioxydants, des pro-oxydants et des marqueurs lésionnels. La mesure en routine des radicaux libres est impossible compte tenu de leur demi-vie très courte.

Il reste donc l'évaluation des marqueurs de l'inflammation comme le TNF- α ou IL-6, des marqueurs lésionnels musculaires comme les CK et ASAT et des marqueurs des lésions oxydatives (dérivés de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines et de l'ADN) (Defontis, Richard, et Pitel 2013).

Il a été montré que la surexpression des HSP est corrélée à une augmentation de l'activité enzymatique de la CAT ou de la SOD (Wirth et al. 2003; Siu et al. 2004), les HSP réagissent alors à l'apparition d'ERO et déclenchent des mécanismes de survie de la cellule, ce qui leur confère un rôle indirect d'anti-oxydant. TNF- α , de son côté, peut entraîner des dommages mitochondriaux responsables d'une augmentation de la production d'ERO ainsi que stimuler la production de NO $^{\circ}$ en cas de situation inflammatoires (Henrotin, Bruckner, et Pujol 2003). Il a alors un rôle pro-inflammatoire.

2. Stress oxydant en pratique

Chez le cheval athlète, le stress oxydant s'exprime cliniquement par des myopathies à l'exercice, des hémorragies pulmonaires induites à l'exercice, la maladie inflammatoire des voies respiratoires profondes ou la maladie obstructive des voies respiratoires profondes. D'autres affections dégénératives telles que l'arthrose, l'ostéochondrose, la maladie du motoneurone ou la maladie de l'herbe pourraient également être concernées (Dubois et al. 2015; De Moffarts et al. 2005).

La fatigue musculaire en elle-même est due à l'accumulation d'acide lactique mais aussi au stress oxydant et aux dommages qu'il cause dans la cellule musculaire. En effet, la perturbation des échanges calciques par le stress oxydant aboutit à l'apoptose de la cellule musculaire (Csordás et Hajnóczky 2009).

Il semble que certaines ERO jouent un rôle dans la signalisation, un léger stress ne serait alors pas néfaste pour l'organisme qui autorise les ERO à travailler pour lui en minimisant les dommages créés (comme par exemple le « respiratory burst », très utile mais générateur d'ERO) (Halliwell 2012). De plus, l'entraînement, en générant des ERO et des conditions difficiles pour l'organisme, habitue l'organisme et augmente sa capacité antioxydante (Johnson 2006).

Comment s'articulent les interactions entre l'exercice physique et les marqueurs choisis ?

V) Exercice physique et implication de Hsp72, IL-6 et TNF- α

A) Hsp72 et exercice physique

Il a été montré que la concentration en HSP augmentait lors d'exercice. En effet, plusieurs stress vont se cumuler et entraîner des réponses à différents niveaux (Morton, Kayani, et al. 2009).

1. Stress thermique

Lors d'exercice physique, la température dans le muscle peut dépasser 40°C (Geor et al. 1995). Ce stress enclenche la production de HSP pour protéger le muscle.

2. Stress oxydant

Le cheval est un grand consommateur d'oxygène lors d'exercice physique (Butler et al. 1993). Une partie de cet oxygène est transformé en anions superoxydes. Un état oxydant se met en place pendant ou après certains exercices physiques et est également un facteur déclenchant la production de HSP.

3. Acidose

L'accumulation d'acide lactique dans le muscle crée un environnement acide extrêmement délétère pour la cellule et est un signal pour la traduction des gènes des HSP. Lorsque la cellule atteint le point où elle ne peut plus convertir le lactate en énergie, alors Hsp72 est produite (Pösö et al. 2002).

4. Stress énergétique

La consommation des réserves d'ATP et de glycogène entraîne une élévation de Hsp70 post-effort dans le muscle (Febbraio et al. 2002). Il faut que l'exercice soit extrêmement demandeur en énergie pour que la production d'Hsp70 s'enclenche, c'est la plupart du temps un autre stress (augmentation des lactates ou stress oxydant) qui engendre la demande (Pösö et al. 2002).

5. Actions dans les cellules musculaires

Dans la cellule musculaire squelettique, les HSP réduisent les dommages causés par les contractions musculaires. Les HSP réagissent en se liant au cytosquelette et aux protéines des myofibrilles pour les stabiliser lors d'exercice ; elles agissent également post-effort pour redonner sa conformation au muscle abîmé (Paulsen et al. 2007). Elles aident à maintenir l'homéostasie dans les cellules des muscles posturaux riches en fibres lentes (la concentration basale en Hsp70 y est plus élevée) (Morton et al. 2006). De plus elles facilitent le remodelage du muscle en activant les cellules satellites (Oishi et al. 2009; Touchberry et al. 2012; Paulsen et al. 2007).

Dans la cellule musculaire cardiaque, les HSP améliorent la fonction cardiaque après une ischémie et sont impliquées à plusieurs niveaux dans les affections cardiaques chroniques (dans la protection pour Hsp70 ou Hsp27 mais aussi en tant que facteur pro-apoptotique pour Hsp60).

Néanmoins tous les tissus musculaires ne réagissent pas pareil et semblent avoir un seuil de réponse au stress différent, en fonction, entre autre, du type d'exercice effectué (excentrique *versus* concentrique ou isométrique), de sa durée et de son intensité, ainsi que du phénotype du muscle (Milne et Noble 2002; Avenatti 2014).

Exercice concentrique, excentrique et isométrique :

- ✓ L'exercice concentrique correspond au mouvement fait pour contracter le muscle (soulever une charge).
- ✓ L'exercice excentrique correspond au mouvement fait pour étirer le muscle (reposer une charge).
- ✓ L'exercice isométrique correspond à une contraction du muscle sans mouvement, en résistance (essai de soulever une charge lourde).
- ✓ Chacun de ces exercices a un impact différent sur les cellules striées squelettiques et leur homéostasie, l'exercice excentrique endommageant plus le muscle que l'exercice concentrique (Febbraio et Koukoulas 2000).

Il y a donc au moins deux types de réponse : une réponse rapide pour gérer la crise et une réponse à plus long terme associée à la récupération et à l'adaptation. La cellule reste alors dans un état transitoire de tolérance au stress (thermotolérance) où la concentration en HSP est plus élevée que d'habitude (résumé Figure 16).

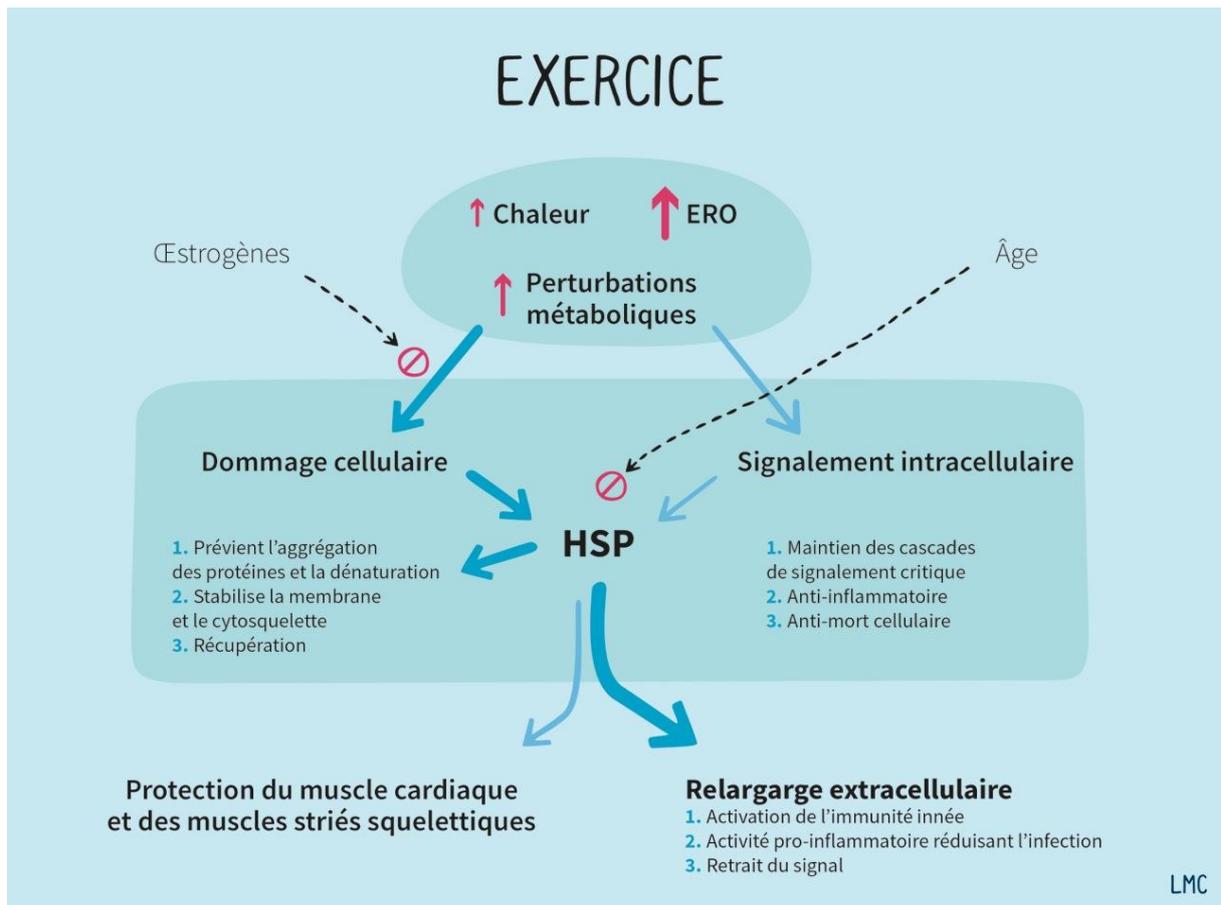


Figure 16 : effet de l'exercice sur la cellule musculaire striée squelettique – adapté par LMC de (Noble, Milne, et Melling 2008)

Il a été montré qu'un exercice physique intense permettait d'augmenter la concentration basale en Hsp70 dans la cellule musculaire (Tupling 2008; Morton, Holloway, et al. 2009), que ce soit au niveau cardiaque ou squelettique. Febbraio et al affirment néanmoins que Hsp72 est relargué dans la circulation systémique lors d'un effort physique et que ce ne sont pas les muscles qui produisent cette protéine mais d'autres organes comme le foie (Febbraio et al. 2002). Ainsi, la concentration augmente dans les muscles (mais ces protéines produites *in-situ* restent dans le tissu contractile) et dans la circulation (et ces HSP sont produites par d'autres organes loin du tissu en souffrance).

Les HSP ont la capacité de contrôler la synthèse et la dégradation des protéines musculaires et sont de fait des acteurs importants de la régulation de la masse musculaire lors d'exercice physique ; de même, l'exercice physique régulier est un moyen d'augmenter la concentration en HSP dans le muscle (Venojärvi et al. 2013; Kinnunen 2011; Marini et Veicsteinas 2010).

L'exercice physique et le préconditionnement qu'il implique en générant un léger niveau de stress oxydant semblent protéger davantage l'organisme du stress oxydant que les suppléments nutritionnels existants. En effet, Halliwell met le doigt sur le peu d'utilité de ce type de stratégie : les aliments et compléments antioxydants sont très souvent mal conservés et ont au contraire un effet pro-oxydant dans l'organisme (Halliwell 2012). Cet effet pro-oxydant aboutit à la stimulation des enzymes et autres stratégies antioxydantes propres à la cellule. Il faudrait donc trouver un moyen de stimuler les systèmes de défense antioxydants et les moyens de défenses de la cellule en amont, et c'est ce que le Proteostress équin a vocation de faire.

Une étude va plus loin en affirmant qu'un certain niveau de stress oxydant est nécessaire pour le bon fonctionnement musculaire au cours de l'exercice, la supplémentation en antioxydants ayant été bénéfique pour les sujets âgés (en augmentant la perfusion) mais délétère pour les jeunes sujets (Wray et al. 2009). En effet, les ERO générés en faible concentration vont faciliter le relargage du calcium qui est nécessaire aux contractions musculaires et abaisser le seuil de sensibilité des fibres musculaires au calcium (De Moffarts et al. 2005).

B) IL-6, TNF- α et exercice physique

Plusieurs cytokines peuvent être détectées dans le plasma pendant et après un exercice physique, dont IL-6 et TNF- α (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001).

IL-6 est produit en très grande quantité par rapport aux autres cytokines lors d'exercice physique, à chaque contraction des muscles squelettiques, et pas uniquement en cas de blessure musculaire. Par contre, une blessure entraînera une augmentation de la production d'IL-6 suite au recrutement de macrophages, mais dans une moindre mesure.

Une augmentation d'IL-6 accompagnerait l'augmentation de TNF- α et de IL-1 β pendant l'activité sportive selon Ostrowski et al (Ostrowski et al. 1998), Pedersen et al indiquent néanmoins le contraire : IL-6 inhiberait la production de TNF- α et d'IL-6 (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001). Cette augmentation s'accompagnerait également d'une augmentation d'adrénaline (Steensberg, Toft, et al. 2001), d'une fréquence cardiaque élevée (Ostrowski et al. 1998) et d'un manque de glycogène (Febbraio et al. 2002; Steensberg, Febbraio, et al. 2001).

Cette dernière relation laisse à penser que l'IL-6 produite par le muscle règle l'arrivée de glucose (produit par le foie) et aide au maintien de l'homéostasie de la glycémie. De plus, Stouthard et al ont montré qu'IL-6 est responsable d'une augmentation du nombre et de la translocation des récepteurs au glucose GLUT-1 et -4 dans les adipocytes (Stouthard, Oude Elferink, et Sauerwein 1996). TNF- α , de son côté, provoque l'inhibition de GLUT-4 et de l'activité des récepteurs à l'insuline, promeut l'insulinorésistance, le diabète de type 2 et l'artériosclérose (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001).

Le NF- κ -B est activé par la liaison du LPS et de TNF- α sur ses récepteurs, qui lui-même induit les gènes codant pour IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α et COX2 (Dubois et al. 2015).

IL-6 est aussi responsable de la lipolyse des triglycérides pendant l'exercice physique. TNF- α étant surexprimé par les cellules adipeuses, IL-6 a de nouveau un effet antagoniste sur le TNF.

IL-6 joue un rôle dans la prolifération et la différenciation des myoblastes ainsi que dans la prolifération des cellules satellites (régulée par une sécrétion autocrine d'IL-6). Au niveau vasculaire, IL-6 est capable d'induire VEGF, le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires, et donc de promouvoir de nouveaux capillaires sanguins pour alimenter le muscle.

La Figure 17 résume les relations entre IL-6 et les organes évoqués ci-dessus.

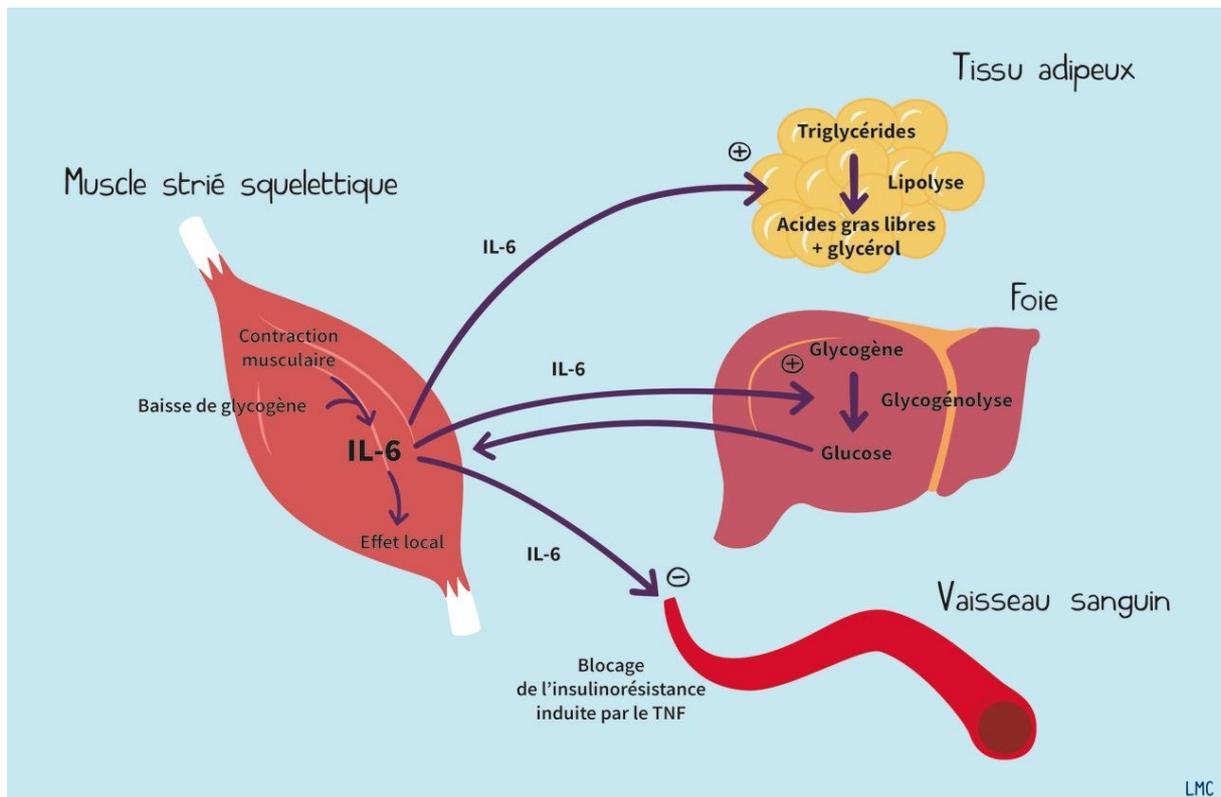


Figure 17 : actions de l'interleukine 6 au cours de l'exercice physique – adapté par LMC de (Pedersen, Steensberg, et Schjerling 2001)

Néanmoins, il existe une différence dans la production d'IL-6 en fonction de la nature de l'exercice :

- ✓ En cas d'exercice concentrique, la production d'IL-6 est reliée à la durée de l'exercice par une relation logarithmique, la concentration maximale est atteinte directement post-effort et décroît rapidement pour retrouver les valeurs pré-effort quelques heures plus tard.
- ✓ En cas d'exercice excentrique, la production d'IL-6 atteint ses valeurs maximales quelques heures post-effort et reste élevée pendant quelques jours (Ostrowski et al. 1998).

C) Lien entre ces différentes protéines de l'inflammation

1. Lien entre IL-6 et TNF- α

TNF- α est capable d'induire plusieurs cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-6 et le GM-CSF (Ksontini, MacKay, et Moldawer 1998; Jones 2005). On retrouve plusieurs molécules communes dans les voies de signalisation de IL-6 et TNF- α comme les MAPK ou le GM-CSF.

La recherche se tourne actuellement vers l'emploi d'agonistes ou d'antagonistes de IL-6 en tant que thérapeutiques à certaines dégénération neuronales, néanmoins, la taille des molécules rend difficile voire impossible le passage de la barrière hématopoïétique et la diffusion systémique de telles molécules est impossible à cause des effets secondaires nombreux sur le métabolisme (Gadiant et Otten 1997).

IL-6, IL-1 et TNF- α sont retrouvées en fortes concentrations dans tous les états inflammatoires et sont les cibles de traitement lors de maladies inflammatoires, par exemple le tocilizumab (anticorps monoclonal anti-IL-6) (Scheller et al. 2011).

2. Lien entre Hsp72 et TNF- α

Hsp72 intracellulaire interfère dans la cascade d'activation de TNF- α . Lors de la réponse inflammatoire de l'organisme au choc septique, TNF- α est impliqué via le NF- κ -B (principal facteur de transcription de TNF- α). Une exposition au choc thermique inhibe *in vitro* l'activation de NF- κ -B en réponse à une stimulation pro-inflammatoire (Pritts et al. 2000), ce qui pourrait vouloir dire que les HSP inhibent l'activation du NF- κ -B.

Au contraire, Asea et al ont montré que Hsp70 extracellulaire agit comme une cytokine et est capable d'activer le NF- κ -B et d'augmenter l'expression de TNF- α , de IL-6 et IL-1 β . Une voie dépendante de CD14 et du calcium intracellulaire augmente l'expression de TNF- α , de IL-6 et IL-1 β , une voie indépendante de CD14 mais dépendante du calcium intracellulaire résulte uniquement en une augmentation de l'expression de TNF- α (Asea et al. 2000).

Ribeiro et al, de leur côté, ont montré que Hsp70 se lie à I- κ -B, la protéine inhibitrice de NF- κ -B. De plus, il existe une liaison intracellulaire entre Hsp70 et TNF- α dans des macrophages activés qui prévient la libération du TNF- α (Ribeiro et al. 1996). Cela rejoint les conclusions de Pritts.

Au niveau supracellulaire, une répression transcriptionnelle des gènes de TNF- α et IL-1 β est faite par HSF1 (facteur de transcription des HSP) via une liaison à leur promoteur (Singh et al. 2002) comme illustré par la Figure 18.

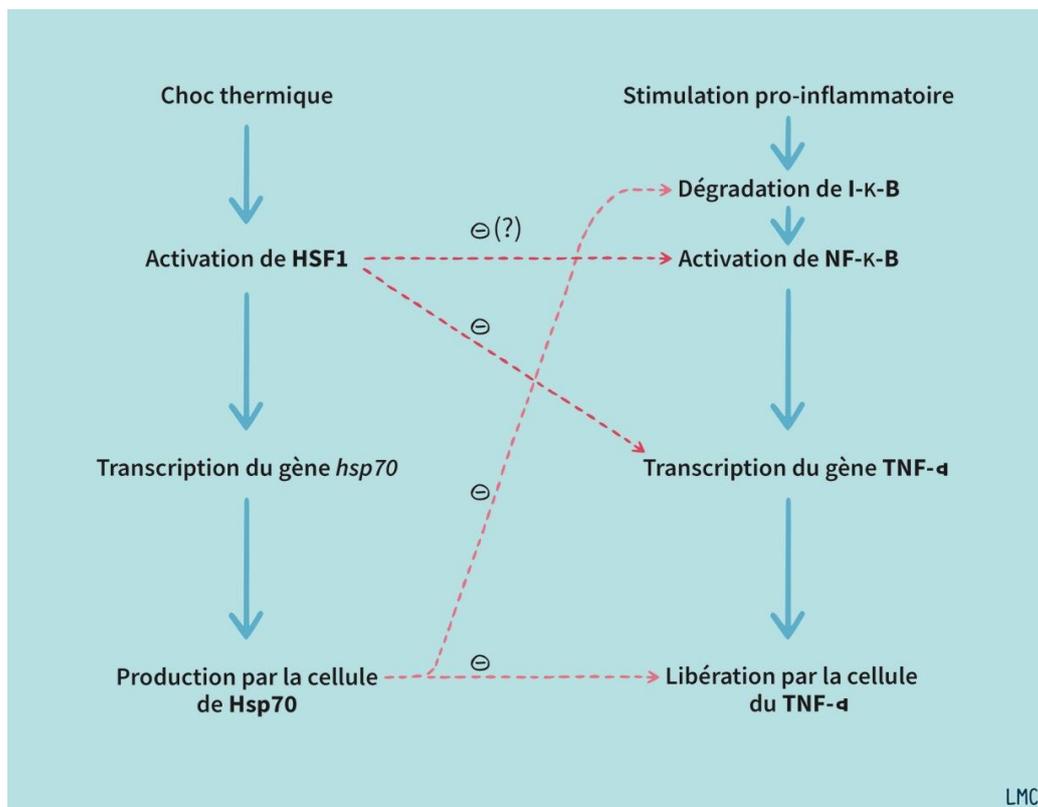


Figure 18 : lien entre la production de Hsp70 et celle de TNF- α – adapté par LMC de (Wirth et al. 2003)

3. Lien entre Hsp72 et IL-6

L'expression de IL-6 est inhibée chez les animaux ayant subi une hyperthermie préalable, ce qui pourrait vouloir dire que les HSP induites par le choc thermique inhibent certains signaux menant à l'activation d'IL-6 (LoCicero, Xu, et Zhang 1999; Wirth et al. 2003). Febbraio et al ont montré que l'infusion de IL-6 était capable d'activer Hsp72, ce qui correspondrait à un rôle pro-inflammatoire de IL-6 (Febbraio et al. 2002).

Les informations de la littérature sont contradictoires. Cela peut être une conséquence du double rôle que jouent IL-6 et TNF- α , à savoir : être suivant le contexte pro- ou anti-inflammatoires. On peut néanmoins conclure que IL-6 joue un grand rôle dans l'homéostasie de l'organisme lors d'exercice physique. TNF- α , de son côté, est transcrit lors d'exercice physique en réponse à l'inflammation provoquée.

Les HSP, par les rôles nombreux et importants qu'elles jouent dans l'organisme soumis à un stress cellulaire, sont au centre de cette étude pré-clinique.

VII) Le Proteostress équin

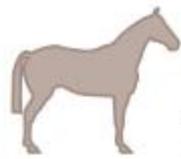
A) En 2012

Le Proteostress équin est un mélange de PORPHYRAL HSP ND et de Vitamine E. La fiche-produit du laboratoire Wamine fournie aux vétérinaires est présentée dans la Figure 19.

Le PORPHYRAL HSP ND a des propriétés de stimulation des HSP en cas de stress métabolique et la vitamine E contribue également à la protection cellulaire via ses propriétés antioxydantes. La composition exacte du Proteostress équin est détaillée dans le Tableau 8.

Tableau 8 : composition du Proteostress équin - issu de la fiche produit Wamine

Présentation :	Flacon de 300mL avec pipette doseuse de 20mL.	
Mode d'emploi :	Chez les chevaux : 2 fois 20mL par jour.	
Durée de la complémentation :	7 jours – renouvelable si besoin.	
Composition par dose de 40mL :	PORPHYRAL HSP ND	
	(extrait d'algue <i>Porphyra umbilicalis</i>	2000 mg
	Vitamine E	675 mg
	<i>(équivalent à 13500 mg/kg)</i>	



PROTEOSTRESS Equin

Aide l'organisme à lutter contre
les divers stress environnementaux

Un extrait breveté d'une Rhodophycée, *Porphyra umbilicalis* a la propriété de stimuler l'expression cellulaire de certaines protéines appelées HSPs.



STRESS OXYDANT ET MÉCANISMES DE DÉFENSE CELLULAIRE



TESTÉ SANS RÉSIDUS DOPANTS

↳ **PROTEOSTRESS EQUIN** a été testé par le Laboratoire des Courses Hippiques à Châtenay-Malabry, de façon à s'assurer que le produit est exempt de contaminants naturels susceptibles de rendre positif par eux-même le contrôle anti-dopage.

Figure 19 : fiche du Proteostress équin - issu de la fiche produit Wamine

1. Le PORPHYRAL HSP ND

Le PORPHYRAL HSP ND est un ingrédient breveté et développé par le laboratoire PiLeJe. Il est issu d'une algue rouge alimentaire, *Porphyra umbilicalis*.

Les algues sont utilisées dans l'alimentation humaine depuis très longtemps, particulièrement en Chine, Corée et Japon. L'algue rouge du genre *Porphyra* comprend environ 50 espèces dans le monde dont 20 sont présentes au Japon. *Porphyra umbilicalis* est une algue endémique du littoral breton.

Comme beaucoup d'organismes marins, elle est soumise à des conditions environnementales difficiles telles que l'exposition aux UV et les changements de température, ce qui l'a conduite à développer des systèmes de protection cellulaire (Sampath-Wiley, Neefus, et Jahnke 2008). Le laboratoire PiLeJe a développé un ingrédient à partir de cette algue et a recherché si cet extrait présentait un potentiel de protection cellulaire. Un brevet a été déposé suite à des expériences concluantes (numéro FR2832629A1).

1.i – Propriétés antioxydantes

Trois séries d'expériences employant des techniques différentes ont permis de mettre en évidence l'effet antioxydant du PORPHYRAL HSP ND. Il s'agit du test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), de la résonance paramagnétique électronique (RPE) et le test breveté KRL dont les résultats sont rapportés ci-dessous.

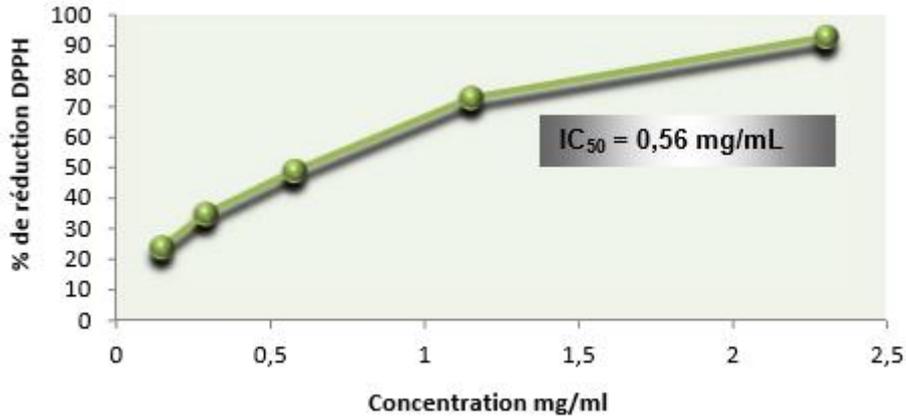


Figure 20 : test au DPPH d'un extrait de *Porphyra umbilicalis* - issu d'un document interne PiLeJe

Le DPPH est un radical libre, tout composé anti-radicalaire est capable de le piéger et de le réduire. Un dosage biochimique permet d'évaluer le pourcentage de DPPH réduit. On peut voir Figure 20 que la quantité d'extrait de *Porphyra umbilicalis* nécessaire pour obtenir de 50 % de DPPH réduit, ou IC₅₀, est de 0,56 mg/mL (en comparaison, la vitamine E possède un IC₅₀ de 0,006 mg/ml).

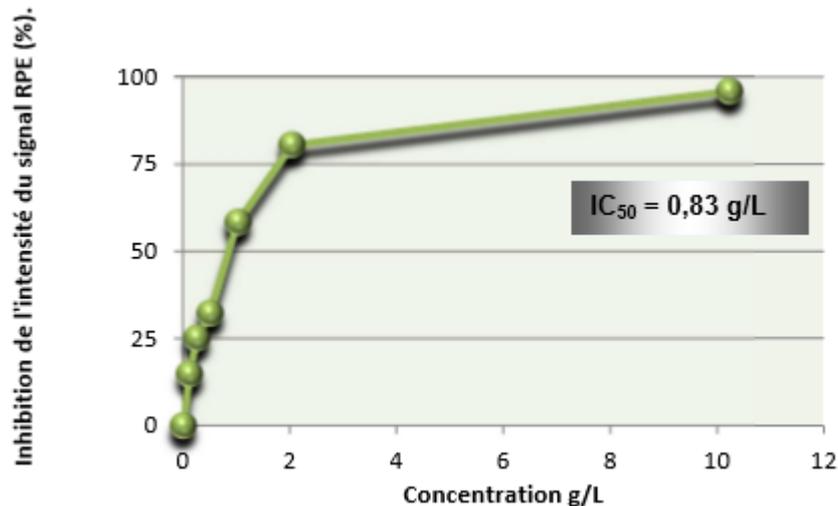


Figure 21 : test de la résonance paramagnétique électronique d'un extrait de *Porphyra umbilicalis* – issu d'un document interne PiLeJe

Des radicaux libres sont mis en présence d'une substance capable de les piéger et cette dernière émet un signal, RPE, dont l'intensité dépend du nombre de radicaux libres piégés. Ce signal est détecté par un appareil utilisant une technique proche de la RMN. Une substance anti-radicalaire sera capable de diminuer l'intensité du signal. La quantité de l'extrait de *Porphyra umbilicalis* pour réduire de 50 % le signal RPE et donc la production de radicaux libres, ou IC₅₀, est de 0,83 g/L, ce qui est dans la gamme de concentration des références antioxydantes (0,1g/L < IC₅₀ < 1 g/L) (Figure 21).

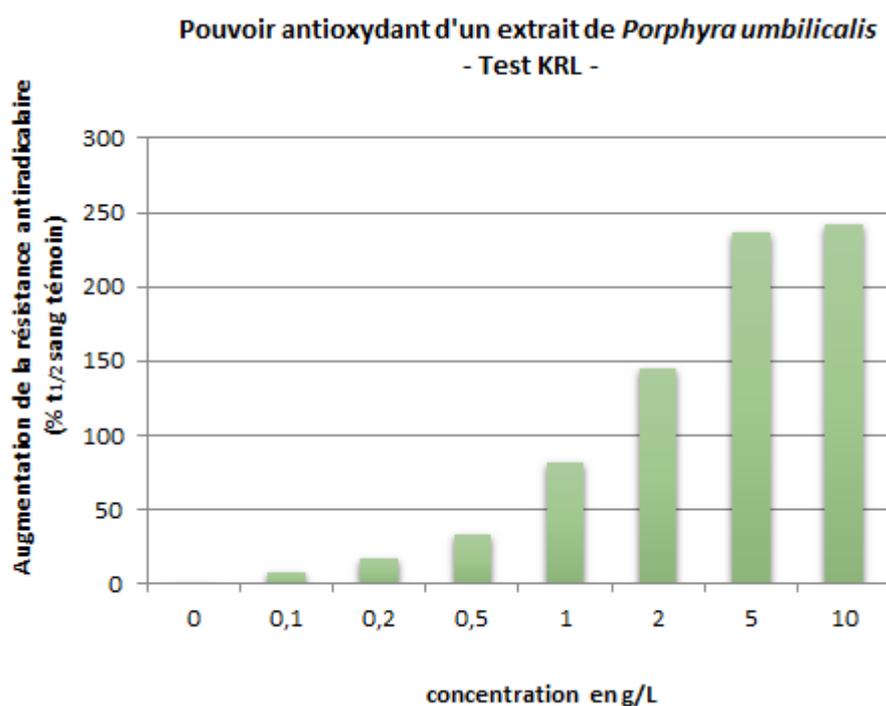


Figure 22 : test KRL d'un extrait de *Porphyra umbilicalis* - issu d'un document interne PiLeJe

Des cellules sanguines sont soumises à une attaque radicalaire en présence ou non de différentes concentrations du produit à potentiel anti-radicalaire. Les défenses anti-oxydantes intra- et extra-cellulaires vont être sollicitées et limiter la lyse des cellules. Un composé à action anti-radicalaire augmentera le potentiel de défense contre l'agression radicalaire et augmentera le nombre de cellules non lysées. La Figure 22 montre qu'en présence de l'extrait de *Porphyra umbilicalis*, la résistance du sang à l'attaque radicalaire augmente progressivement. Elle est deux fois supérieure au témoin à 1,5 g/L et atteint une activité maximale (242 % de la résistance du témoin) pour une concentration de 10 g/L.

1.ii – Propriétés vis à vis des UV

L'effet protecteur du PORPHYRAL HSP ND vis à vis du rayonnement UV a été évalué par le test 3D. Il permet de mesurer les lésions de l'ADN qui ont eu lieu pendant l'exposition aux UV grâce à l'incorporation d'un marqueur au moment de la réparation de l'ADN. La révélation de ce marqueur se fait par chimioluminescence. Une substance protégeant l'ADN des cassures liées aux UV diminuera l'intensité de chimioluminescence.

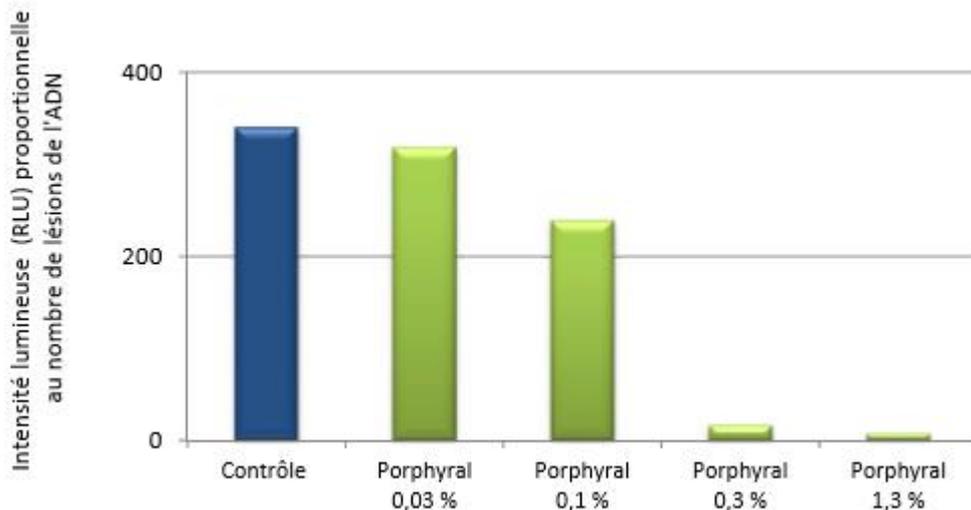


Figure 23 : effet de l'extrait de *Porphyra umbilicalis* sur le nombre de lésions de l'ADN induites par les UV - issu d'un document interne PiLeJe

Le PORPHYRAL HSP ND à la concentration de 0,3% réduit de 95% le nombre de lésions induites par les UV (Figure 23).

1.iii – Propriétés vis à vis de l'expression des HSP

Une autre série d'expériences a permis d'évaluer l'effet de l'ingrédient vis-à-vis de la synthèse de HSP lors d'un stress, ici le choc thermique. Il a d'abord été montré que le PORPHYRAL HSP ND ne stimule pas la synthèse d'HSP en absence de stress et ne modifie donc pas le mode de fonctionnement physiologique de ce système de défense.

Deux approches ont été utilisées pour suivre l'effet du PORPHYRAL HSP ND lors d'un stress.

La première approche a permis de vérifier si PORPHYRAL HSP ND est capable de stimuler l'expression du gène codant pour Hsp70. La méthode utilisée est celle du gène rapporteur dont l'expression dépend de la stimulation d'un promoteur déterminé, ici il s'agit de celui de Hsp70 placé devant le gène hGH dans des cellules de rongeur.

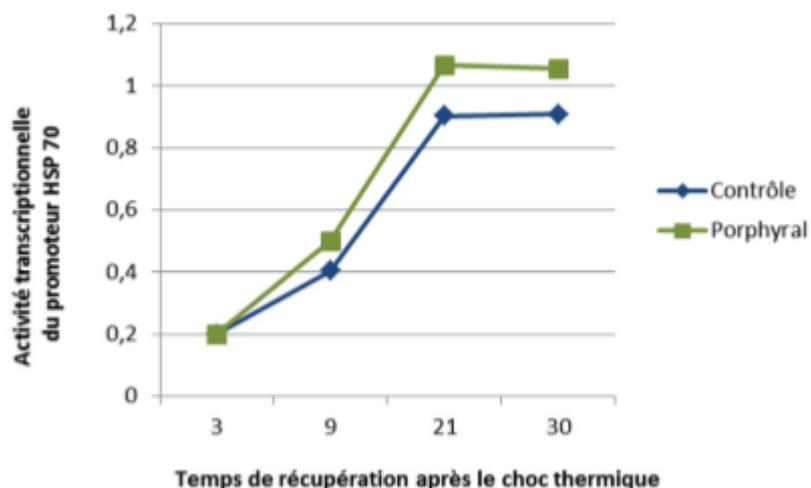


Figure 24 : expression de Hsp70 après un choc thermique avec et sans traitement au PORPHYRAL HSP ND - issu d'un document interne PiLeJe

Comme le montrent les courbes Figure 24, le choc thermique entraîne une augmentation de l'expression de ce gène rapporteur. L'augmentation est plus importante lorsque les cellules sont pré-incubées avec le PORPHYRAL HSP ND.

La seconde approche, plus directe, a suivi l'induction de l'expression de différentes protéines HSP après un choc thermique avec et sans pré-traitement avec le PORPHYRAL HSP ND. Le suivi se fait par Western blot dont les résultats sont visibles Figure 25.

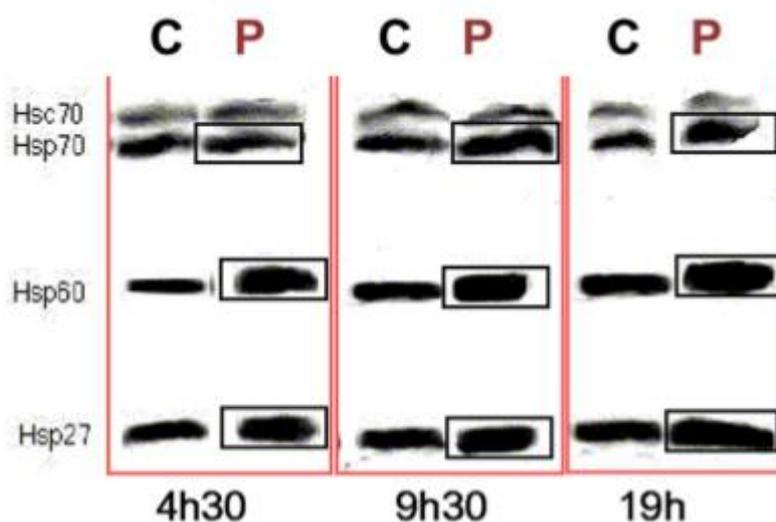


Figure 25 : Western blot avec et sans traitement au PORPHYRAL HSP ND (C : choc thermique, P : PORPHYRAL HSP ND + choc thermique) - issu d'un document interne PiLeJe

Le PORPHYRAL HSP ND stimule la synthèse de Hsp27, 60 et 70 après un choc thermique. La synthèse des HSP est plus précoce que dans les cellules contrôles.

Le PORPHYRAL HSP ND a donc la particularité de stimuler l'expression de certaines HSP uniquement en situation de stress. Ces protéines HSP jouent principalement un rôle de chaperon, c'est-à-dire qu'elles vont reconnaître les protéines endommagées par un stress et leur permettre de retrouver leur conformation native.

En conclusion, le PORPHYRAL HSP ND renforce les systèmes de protection cellulaire via la stimulation de la synthèse des protéines HSP lors d'un stress, via un effet antioxydant et via un effet de protection contre les rayonnements UV.

Comme précisé ci-dessus, le PORPHYRAL HSP ND n'augmente la synthèse des protéines HSP qu'en situation de stress.

2. La vitamine E

2.i – Caractéristiques

La vitamine E est un terme générique qui désigne un ensemble de 8 composés aromatiques (4 tocophérols et 4 tocotriénols). Tous sont composés d'une tête aromatique chromanol et d'une queue isoprénoïde. La structure de la vitamine E est représentée Figure 26.

Parmi les 8 composés aromatiques, l' α -tocophérol est prédominant chez la majorité des espèces et possède la plus forte activité biologique (Johnson 2006).

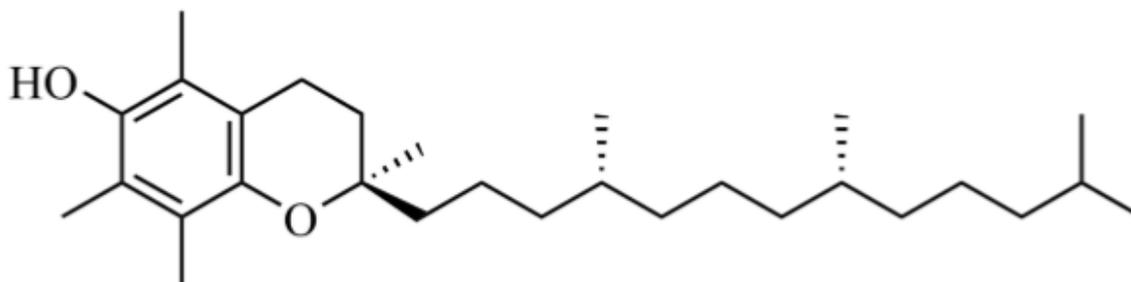
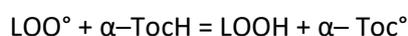


Figure 26 : formule de l' α -tocophérol – issu de (Dubois et al. 2015)

2.ii – Mode d'action

La vitamine E est le principal agent antioxydant non enzymatique au sein des membranes cellulaires (elle se trouve dans la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique), c'est un antioxydant lipidique et un stabilisant des membranes (Johnson 2006; De Moffarts et al. 2005). 90% de la vitamine E est stockée dans les réserves lipidiques de l'organisme (Blatt, 2001).

Elle bloque le phénomène de peroxydation lipidique en captant les radicaux libres générés au cours du processus de l'attaque oxydative selon les réactions suivantes :



Une molécule d' α -tocophérol réduit ainsi deux radicaux peroxydes (Dubois et al. 2015).

La vitamine E joue donc un rôle important dans l'intégrité des cellules et par extension dans la préservation du tissu et de ses fonctions mais n'est pas synthétisée par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation. La composition de l'alimentation ou de la supplémentation joue alors un rôle primordial dans la capacité de l'organisme à se défendre contre la production non contrôlée d'ERO. Néanmoins, la supplémentation permet d'augmenter les réserves en vitamine E seulement trois à quatre fois plus (Blatt, 2001).

La vitamine C permet le recyclage de la vitamine E par une réaction d'oxydo-réduction, la vitamine E oxydée est réduite par la vitamine C qui devient alors elle-même oxydée et génère un radical ascorbyl au potentiel redox très faible. Ce radical se dismute ensuite en acide déhydroascorbique (DHA) et ascorbate (Dubois et al. 2015).

2.iii – Vitamine E et stress oxydant

Chez le cheval, l'intérêt de la vitamine E sur le stress oxydant a été évalué dans quelques études. Le contexte inducteur de stress oxydant le plus souvent utilisé est l'exercice physique. En 2013, Rey et ses collaborateurs ont évalué l'impact de la supplémentation en vitamine E (1400 UI/jour d' α -tocophérol naturel sous forme micellaire) à court (1 jour, ST) et long terme (8 jours, LT) sur le statut antioxydant de chevaux de course soumis à un entraînement intensif.

Les concentrations sanguines en α -tocophérol ont été mesurées 1h avant (BEF), juste après (END) et 8h après l'entraînement intensif (+8h). Les résultats montrent que dans le groupe qui a reçu la vitamine E pendant 8 jours (LT) l'augmentation de la concentration sérique est environ 1,6 fois plus importante à chaque temps que dans le groupe contrôle

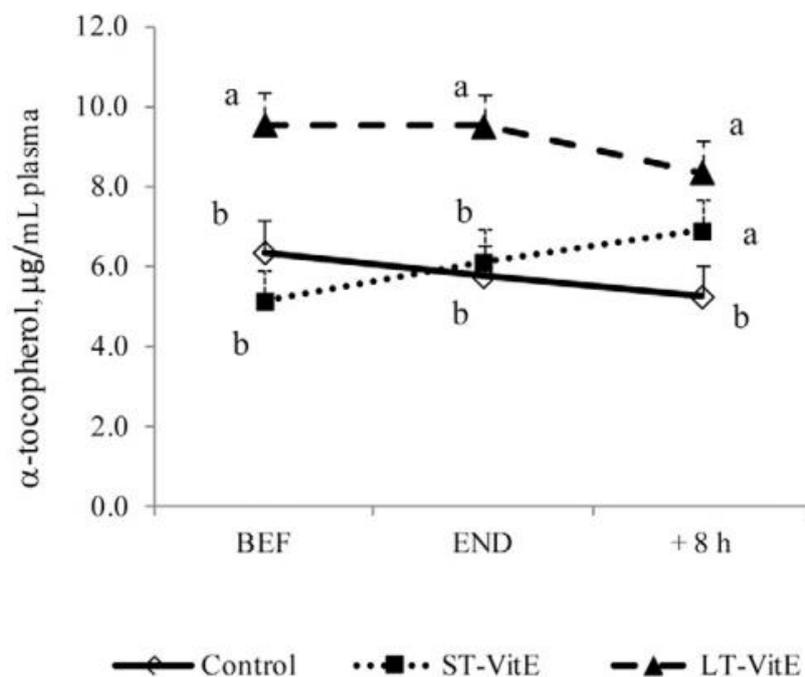


Figure 27 : capacité antioxydante du sang au cours du temps - issu de (Rey et al. 2013)

La capacité antioxydante du sang a été évaluée par la méthode TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity). Elle est supérieure dans le groupe LT à chaque temps comparativement au groupe contrôle (Figure 27).

Ces résultats suggèrent que la supplémentation pendant 8 jours en vitamine E permettrait de maintenir un statut antioxydant adéquat vis-à-vis d'une situation provoquant un stress oxydant (Rey et al. 2013). Néanmoins, Johnson n'aboutit pas aux mêmes résultats malgré une forte supplémentation en vitamine E, suggérant que cette augmentation est corrélée au statut antioxydant du cheval. Ainsi, la supplémentation ne sera pas utile pour un cheval qui n'en a pas besoin (Johnson 2006).

De son côté, Fischer et al analysent la façon dont une supplémentation en vitamine E impacte l'induction de Hsp72 par l'exercice et conclut que la supplémentation en γ -tocophérol diminue l'induction de Hsp72. Un mécanisme plausible pourrait être que l'organisme se concentre sur la

stratégie anti-oxydante la plus « facile » (la vitamine E en surabondance) et n'incite pas sa machinerie cellulaire à produire des HSP, ou encore que le γ -tocophérol inhibe la production de Hsp72 (Fischer et al. 2006).

Le complément Proteostress équin possède donc des qualités de supplémentation en anti-oxydants qui doivent encore être prouvées *in vivo*.

B) Retours de la pratique en clientèle privée en 2013

1. En canine

Une enquête papier a été réalisée auprès de 20 vétérinaires via un questionnaire envoyé par mail. Trente-deux cas ont été retournés. La représentation des résultats a été faite avec un diagramme camembert (Figure 28).

L'indication du Proteostress Petits animaux ND est d'aider l'organisme à lutter dans les situations de stress, après un effort intense ou lors de chirurgie. Néanmoins, les affections pour lesquelles les praticiens utilisent ce complément sont nombreuses et variées.

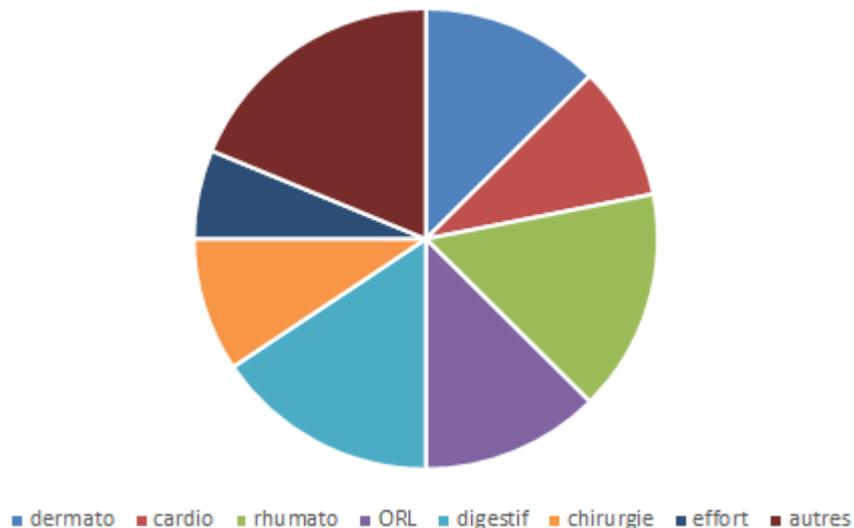


Figure 28 : domaines d'utilisation du Proteostress Petits animaux ND - issu des données de l'enquête réalisée par Wamine auprès de 20 praticiens en 2013

Les praticiens comme les clients sont très satisfaits de l'utilisation faite et de l'efficacité du Proteostress Petits animaux ND (enquête – données non publiées).

En ce qui concerne l'utilisation du Proteostress Petits animaux ND, il apparaît qu'il n'est jamais prescrit seul. Les praticiens le couplent très souvent avec des Extraits de Plantes Standardisés (EPS), souvent avec de l'allopathie ou d'autres médecines complémentaires. Les résultats sont résumés dans la Figure 29.

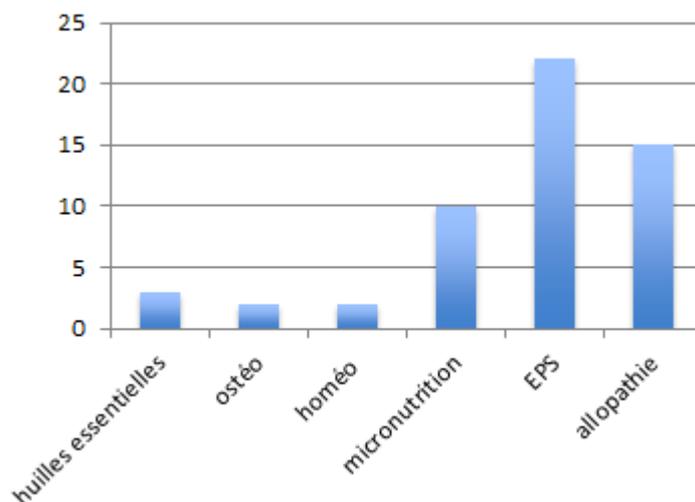


Figure 29 : thérapie adjuvante au Proteostress Petits animaux – issu des données de l'enquête réalisée par Wamine auprès de 20 praticiens en 2013

2. En équine

Un très faible nombre de flacons de Proteostress équine a été vendu entre 2012 et 2013 (36 flacons) et seuls 3 praticiens équins ont répondu à l'enquête téléphonique.

Il en ressort que ces vétérinaires ne sont pas habitués à ce nouveau produit et ne pensent pas à le prescrire. De plus, la cible thérapeutique est mal identifiée, ce qui ne facilite pas la prescription.

Lorsque le Proteostress équine est utilisé, c'est systématiquement avec de la phytothérapie en préparation au concours, lors d'états inflammatoires aigus, de traumatismes ou d'états de choc.

L'utilisation anecdotique sur des bovins est notable, en complément de traitements allopathiques pour des affections sub-aiguës ou pour des veaux en diarrhée.

C) Aujourd'hui

Le Proteostress équine est actuellement en reformulation. Le laboratoire Wamine souhaite réévaluer la concentration en PORPHYRAL HSP ND et sa stabilité dans le temps.

Il serait intéressant de montrer que le PORPHYRAL HSP ND a une action ciblée sur les HSP, et plus particulièrement Hsp72, principale protéine de stress, dans le cas d'un cheval athlète à l'exercice.

IL-6 et TNF- α sont retrouvés en fortes concentrations dans tous les états inflammatoires et plusieurs études ont montré que l'exercice physique avait une action sur ces deux cytokines.

Le suivi de ces marqueurs a donc été décidé dans le cadre d'une étude pré-clinique sur l'impact du PORPHYRAL HSP ND couplé à la vitamine E dans le cas d'un exercice physique de forte intensité.

Deuxième partie : partie expérimentale

I) Expérience menée en 2012 à l'Ecole Nationale d'Equitation

L'administration d'extraits de plantes ou de compléments alimentaires, tout comme l'administration de traitements allopathiques classiquement utilisés en médecine vétérinaire, peut conduire à la présence dans le sang et/ou les urines de molécules identifiées comme étant dopantes et positivant de ce fait les contrôles anti-dopage réalisés lors de compétitions équin.

L'administration de PORPHYRAL HSP ND, principal principe actif du Proteostress équin, devrait augmenter le seuil de réactivité de la cellule musculaire au stress induit par l'exercice physique en stimulant la transcription d'Hsp72 et en diminuant les concentrations systémiques d'IL-6 et TNF- α .

L'objectif de cette étude est d'apporter les preuves de la compatibilité de la phytothérapie avec la compétition et ainsi de rassurer les prescripteurs de phytothérapie et les propriétaires de chevaux, ainsi que d'apporter les preuves scientifiques de l'efficacité du traitement au Proteostress équin.

Les hypothèses étaient les suivantes :

- *le Proteostress équin n'est pas dopant et peut être administré sans problème aux chevaux de sport*
- *le Proteostress équin augmente la concentration systémique en Hsp72 et entraîne une meilleure réponse au stress cellulaire suite à un exercice physique*
- *le Proteostress équin diminue la concentration systémique des marqueurs de l'inflammation IL-6 et TNF- α*

Le financement de cette expérience est pris en charge par le laboratoire Wamine pour LARENA Santé qui a la propriété du brevet du PORPHYRAL HSP ND et commercialise le produit Proteostress équin.

A) Les différents acteurs

1. Le laboratoire Wamine

Wamine, laboratoire créé en 2002, est la branche destinée aux animaux de Larena Santé et bénéficie de ses 20 ans d'expertise dans la recherche en phytothérapie et en micronutrition. Wamine propose des produits optimisant le fonctionnement de l'organisme tels que des compléments alimentaires (micronutrition) ou des extraits standardisés de plantes (phytothérapie).

La phytothérapie moderne utilise des extraits standardisés de plantes (EPS) reconnus pour leurs principes actifs naturels. Les EPS sont des extraits de plantes issue préférentiellement de l'agriculture raisonnée en solutions standardisées glycinées dans lesquelles on retrouve le *totum* de la plante. La méthode utilisée consiste en un cryobroyage suivi d'une lixiviation permettant de respecter l'intégrité des principes actifs de la plante.

La micronutrition animale est une approche originale qui choisit d'étudier divers ingrédients qui composent l'alimentation des animaux et la façon dont leur organisme les utilise. Pour ce faire, le laboratoire Wamine s'est appuyé sur les recherches effectuées sur les liens avérés entre l'alimentation et l'état de santé au sein du groupe PiLeJe (branche humaine de LARENA) pour développer des solutions participant au maintien et à la protection du fonctionnement de l'organisme : probiotiques, stimulation des protéines de stress, vitamines, minéraux, oligoéléments, acides gras essentiels.

Wamine s'attache à rechercher et développer des solutions dans les domaines suivant :

- *L'équilibre du microbiote*
- *Le stress métabolique*
- *L'immunité*

La phytothérapie est une médecine complémentaire régulièrement utilisée en pratique vétérinaire canine, équine et même bovine, avec des applications dans les domaines digestifs, infectieux, articulaires, respiratoires, ...

Depuis quelques années, le laboratoire Wamine a une convention de partenariat avec la clinique vétérinaire de l'Ecole Nationale d'Equitation (ENE - Cadre Noir) à Saumur (49). Cette collaboration permet non seulement de se confronter aux problématiques rencontrées chez le cheval de compétition mais également d'allier l'expertise et les compétences de vétérinaires et de scientifiques pour répondre aux besoins sur le terrain.

Les interlocuteurs sur place sont Claude Faivre, responsable scientifique et développement de Wamine, et Isabelle Guinobert, chargée de recherche chez PiLeJe.

2. L'Ecole Nationale d'Equitation

L'Ecole Nationale d'Equitation (ENE) a été fondée en 1972 et a fusionné en 2010 avec les Haras Nationaux pour former l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (*ifce*). Elle se trouve à Saumur. Le Cadre Noir se trouve au sein de l'ENE et regroupe l'ensemble de ses professeurs.

L'ENE est sous la double tutelle du ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt et du ministère de la Ville, de la Jeunesse et des Sports.

Ses principales missions sont de perfectionner les cadres de l'équitation française au niveau national, de préparer les athlètes aux compétitions nationales et internationales, de participer aux études et recherches techniques et pédagogiques et de conserver et présenter l'équitation de tradition française. Le Cadre Noir a pour mission de perpétuer l'équitation de tradition française et fait partie du patrimoine mondial de l'Unesco depuis 2011 en tant que patrimoine culturel immatériel.

L'ENE possède des carrières, des manèges et des pistes ainsi que des infrastructures liées au bien-être des chevaux, à savoir une clinique vétérinaire et une maréchalerie.

La clinique vétérinaire accueille les chevaux pour des examens locomoteurs ou de médecine et est en capacité d'hospitaliser les cas les plus graves. Une salle de chirurgie permet aux vétérinaires de faire des chirurgies légères mais les coliques et autres opérations lourdes sont référées.

Participant à la préparation des athlètes, la clinique possède une large gamme de physiothérapies : massages, ondes de choc, laser, ostéopathie, acupuncture, ...

De par la fusion avec les Haras Nationaux, une partie de l'activité vétérinaire est tournée vers la reproduction. Les vétérinaires et assistants prélèvent les étalons plusieurs fois par semaine et il est possible de faire du transfert d'embryon.

L'équipe soignante est constituée de trois vétérinaires : Xavier Goupil, Isabelle Burgaud et Matthieu Bez. Quatre assistants vétérinaires et une secrétaire complètent l'équipe.

Les interlocuteurs sur place sont Xavier Goupil, chef des vétérinaires, et Isabelle Burgaud, qui pratique la phytothérapie.

3. Le LABEO Frank Duncombe

Le LABEO Frank Duncombe est devenu le premier pôle public d'analyses et de recherche en Normandie après le regroupement en 2014 des trois laboratoires départementaux du Calvados, de la Manche et de l'Orne.

Le LABEO Frank Duncombe est l'ancien laboratoire départemental du Calvados, il s'occupe d'analyser l'eau, l'environnement et l'alimentation et possède un pôle de recherche et analyse en santé animale. Une partie du personnel fait de la recherche et du développement, les quatre principaux axes étant la santé du cheval, la surmortalité des huîtres, les produits cidricoles et les polluants de l'environnement. Environ 250 000 échantillons sont traités chaque année.

L'interlocuteur sur place est Eric Richard, chef du service de recherche en biologie clinique. Il travaille principalement sur l'inflammation et l'infection des voies respiratoires profondes et sur les biomarqueurs systémiques précoces des maladies équinnes.

4. Le laboratoire des courses hippiques (LCH)

Le Laboratoire des Courses Hippiques est situé à Verrière-le-Buisson en région parisienne. Il traite tous les prélèvements anti-dopage sur les chevaux de course et de sport (soit environ 30 000 par an). C'est un laboratoire central pour la FEI et est utilisé lors de certaines manifestations de grande ampleur comme les Jeux Equestres Mondiaux qui ont eu lieu à Caen en 2015.

Les échantillons urinaires et sanguins sont reçus et analysés de manière anonyme et une partie est toujours congelée pour contre-expertise.

Le LCH ne réalise pas uniquement des recherches de produits dopants mais travaille également à la recherche de contaminants dans les aliments et compléments alimentaires mis sur le marché. Une partie du personnel fait de la recherche et du développement.

L'interlocuteur sur place est Arnaud Domergue.

B) Etude de l'impact de Proteostress équin sur certains marqueurs biologiques systémiques

Le protocole de l'essai était le suivant : l'étude est divisée en deux sous-parties, l'étude « HSP » et l'étude « dopage ».

Pour l'étude « HSP », c'est un essai cross-over (chaque cheval est son propre témoin). A J0 les sujets n'ont encore reçu aucun traitement, il n'y a donc pas besoin de wash-out.

Le sang des 6 sujets est prélevé à J0 avant l'exercice et 3 et 6 heures après l'exercice. Puis le Proteostress équin leur est administré le soir, et ceci tous les soirs pendant 7 jours. Le même protocole est renouvelé à J2.

Pour l'étude « dopage », le Proteostress équin est administré aux 6 sujets chaque soir pendant une semaine. La dose administrée correspond à cinq fois la dose recommandée par le fabricant. Des prélèvements sanguins et urinaires ont lieu à J7. L'étude « dopage » commence en même temps que l'étude « HSP ».

Le protocole est synthétisé dans la Figure 30.

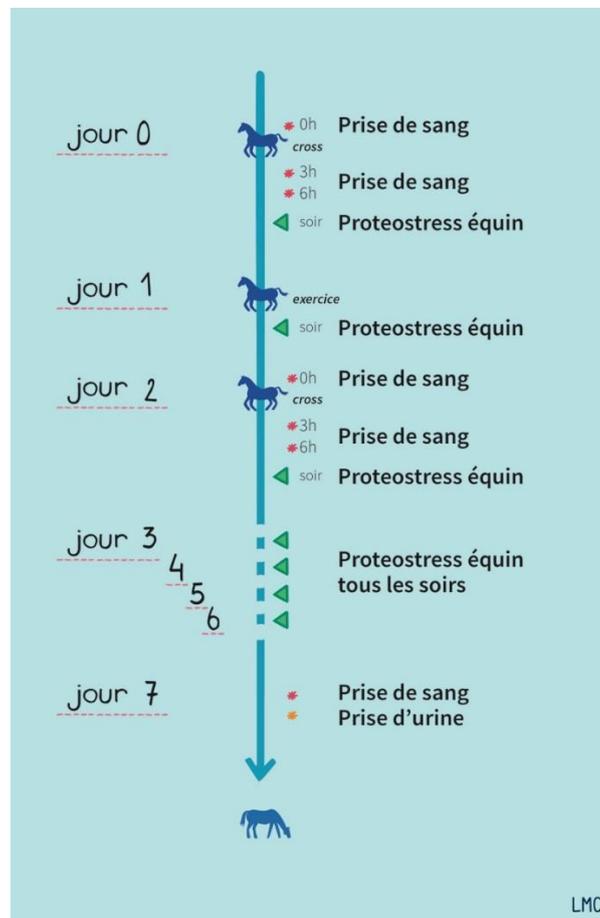


Figure 30 : déroulement des deux expériences "HSP" et "dopage"

1. Matériel et méthode

1.i – Groupe d'étude

Les chevaux participant à cette étude sont des chevaux Selles Français qui travaillent à l'ENE et qui sont utilisés en concours complet d'équitation. Cette discipline regroupe trois épreuves : une épreuve de dressage, une épreuve de cross et une épreuve de concours de saut d'obstacle. L'impact du Proteostress équin sera évalué lors de l'épreuve de cross.

Les cavaliers sont les élèves de l'ENE qui passent l'examen du BEES 2 (brevet d'état d'éducateur sportif de niveau 2).

Le groupe d'étude est constitué de six chevaux de race Selle Français, trois hongres et trois femelles, âgés de 7 à 15 ans.

Leur état de santé est bon et ils sont actuellement à l'exercice. Chaque cheval est identifié par une lettre (de A à F).

Les participants restent dans l'étude tant qu'ils sont en bonne santé et n'ont pas besoin de recevoir des médicaments qui pourraient biaiser l'expérience et/ou être dopant.

1.ii – Déroulement de l'étude

Deux études se déroulent en parallèle : l'étude « HSP » dure de J0 à J2 et l'étude « dopage » commence aussi à J0 et dure jusqu'à J7.

L'étude « HSP » se déroule pendant les trois premiers jours de l'étude « dopage » et commence à J0. Le produit Proteostress équin est administré directement dans la bouche chaque soir à partir de J0 ; les chevaux reçoivent une dose de 100mL.

Des prélèvements sanguins ont lieu avant l'exercice puis 3 et 6 heures après exercice à J0 et à J2 (deux tubes héparinés et quatre tubes secs). L'exercice à J0 a lieu avant la première prise de Proteostress équin.

L'étude « dopage » dure 8 jours et les chevaux reçoivent une semaine de traitement.

La dose administrée correspond à 5 fois la dose recommandée dans la notice du Proteostress équin soit 100mL de solution. Il s'agit du protocole usuel de recherche de produit dopant en étude.

Chaque cheval reçoit 100mL de Proteostress équin chaque soir à partir de J0 (après le dernier prélèvement sanguin pour l'étude « HSP ») et jusqu'à J6 compris.

Aucun effets secondaires inattendus n'a été rapporté pendant ou après l'étude.

Les échantillons nécessaires au dépistage de substances dopantes sont prélevés avec le kit Berlinger BERGER Horse Kit qui contient 5 tubes de 50mL de sang et un bocal de 500mL d'urine (Figure 31). Ce kit est utilisé par les vétérinaires lors de courses hippiques ou de manifestations sportives nationales ou internationales comme les Jeux Equestres Mondiaux. Il y en a un par cheval présent dans l'étude.



Figure 31 : contenu du Berlinger BERGER Horse Kit - issu du manuel du LCH destiné aux vétérinaires sur le terrain

Les échantillons sanguins et urinaires sont collectés à J7, soit huit jours après le début du traitement au Proteostress Equin, et sont envoyés au Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) à Verrières-le-Buisson. Le transport se fait sous couvert du froid.

1.iii – Exercice effectué à J0 et J2

L'exercice réalisé à J0 est le même parcours de cross qu'à J2 mais dans des conditions d'entraînement (vitesse moins élevée et effort moins intense). Le tracé du parcours se trouve en Annexes 3 et 4 (Figure 40 et Tableau 11).

1.iv – Prélèvement du sang et préparation des aliquots pour l'analyse de Hsp72, IL-6 et TNF- α

Le sang est prélevé à la veine jugulaire gauche ou droite indifféremment à l'aide d'un Vacutainer. Quatre tubes secs et deux tubes héparinés sont prélevés à chaque étape.

Les tubes secs sont centrifugés (3000 x g pendant 5 minutes), le sérum est réparti dans des cryotubes qui sont directement congelés à -20°C en attendant le transport.

Le code d'identification des prélèvements est le suivant : (lettre – chiffre – chiffre – lettre). Par exemple le code C06S correspondra au tube sec du cheval C prélevé à J0 6 heures post-effort.

Code cheval : A B C D E F

Jour de prélèvement : 0 2

Heure de prélèvement : 0 3 6

Type de tube : S H

1.v – Prélèvement du sang pour l'analyse dopage

50mL de sang par cheval sont prélevés à la veine jugulaire gauche ou droite indifféremment dans 5 tubes secs à l'aide d'un Vacutainer.

1.vi – Prélèvement d'urines pour l'analyse dopage

100mL d'urines sont collectés par voie naturelle à l'aide d'une perche.

1.vii – Méthodes d'analyses au Labéo Franck Duncombe

Hsp72, IL-6 et TNF- α sont dosés à l'aide de kits ELISA (R&D Systems et Enzo Life Science, voir Annexes 1, 2 et Figure 39) et le résultat est mesuré par densité optique.

1.viii – Méthodes d'analyses au LCH

Le LCH recherche des produits dopants par chromatographie en phase liquide ou gazeuse à haute performance, couplée à des analyses par spectrométrie de masse sur tout ou partie de l'échantillon et par ELISA.

Le sang et les urines sont analysés, ainsi un produit dopant ayant une faible rémanence dans le sang pourra être détecté dans les urines.

En France, très peu de produits et médicaments sont autorisés chez le cheval de sport ou de course et tout ce qui n'est pas présent naturellement dans l'organisme du cheval est considéré comme dopant.

1.ix – Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus par les dosages faits au LABEO Frank Duncombe sont analysés par un modèle statistique à effets mixtes avec le logiciel R (R Core Team 2013). Le script se trouve en Annexes 5 et 6 (Tableau 12).

Un modèle à effets mixtes, ou modèle lme, est un modèle hiérarchique dans lequel le premier niveau modélise la réponse individuelle, le deuxième niveau modélise le comportement des paramètres pour l'ensemble de la population. Par exemple, pour l'étude de l'effet du traitement au Proteostress équin sur la concentration sérique en Hsp72 le modèle s'écrit :

Niveau individuel : $Hsp_{ik} = \alpha_i + \beta_{1i} \cdot \text{traitement} + \beta_{2i} \cdot \text{temps} + \beta_{1-2i} \cdot \text{traitement} * \text{temps} + \epsilon_{ik}$

Niveau de la population :

$$\begin{aligned}\alpha_i &= \alpha + a_i \\ \beta_{1i} &= \beta_1 + b_{1i} \\ \beta_{2i} &= \beta_2 + b_{2i} \\ \beta_{1-2i} &= \beta_{1-2} + b_{1-2i}\end{aligned}$$

ϵ_{ik} indépendamment et identiquement distribués selon la loi $N(0, \sigma^2)$

σ^2 est la variance résiduelle

$\alpha, \beta_1, \beta_2, \beta_{1-2}$ sont les effets fixes

$a_i, b_{1i}, b_{2i}, b_{1-2i}$ sont les effets aléatoires distribués selon une loi normale

β_1 est l'effet fixe lié à l'effet principal du traitement (tous temps confondus), β_2 est l'effet principal du temps (tous traitements confondus) et β_{1-2} est l'effet fixe de l'interaction du temps et du traitement sur le taux de TNF- α .

La normalité des résidus et des effets aléatoires a été vérifiée et validée pour chaque modèle au moyen de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes (Pinheiro and Bates, 2000).

Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque $p < 0,05$.

2. Résultats et statistiques

2.i – Etude « dopage »

Après analyse des échantillons de sang et d'urine par le LCH, il ressort que le Proteostress équin n'est pas dopant, c'est à dire qu'il n'a produit aucun métabolite présent sur la liste des substances dopantes et recherché par le LCH (liste disponible sur le site internet de la FEI).

Comme précisé dans la partie I) B) 1.viii, le LCH recherche tout ce qui n'est pas présent naturellement dans l'organisme du cheval. Le Proteostress équin ne produit donc aucun métabolite exogène en concentration assez forte pour être détectée.

2.ii – Etude « HSP »

La concentration en Hsp72 était inférieure à la valeur limite de détection pour 4 chevaux au repos (h0). Cette concentration est restée en dessous des limites de détection pour 2 chevaux pour tous les prélèvements de J0.

La concentration en Hsp72 était à nouveau inférieure à la valeur limite de détection pour 3 chevaux à J2 (mais un seul était déjà faible à J0).

➤ Résultats pour chaque groupe et chaque paramètre mesuré

Une moyenne des 6 prélèvements pré-effort (h0) et post-effort (h3 et h6) a été établie pour chaque molécule. Le Tableau 9 concerne les prélèvements avant complémentation au Proteostress équin et le Tableau 10 concerne les prélèvements après complémentation.

Les concentrations moyennes sériques ont ensuite été représentées sur un graphique, chaque molécule prise individuellement (Figures 32, 34, 36), suivies du diagramme des concentrations sériques individuelles (Figures 33, 35, 37).

Tableau 9 : concentrations moyennes (écarts-type) en Hsp72, IL-6 et TNF- α à J0

J0	Hsp72 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Pré-effort	1,07 (1,60)	54,82 (58,29)	348 (197,42)
Post-effort	5,23 (8,40)	58,32 (57,34)	388,29 (257,35)

Tableau 10 : concentrations moyennes (écarts-type) en Hsp72, IL-6 et TNF- α à J2

J2	Hsp72 (ng/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Pré-effort	2,25 (3,52)	47,90 (65,74)	378 (230,22)
Post-effort	1,81 (2,43)	54,38 (76,80)	390,09 (227,15)

➤ Hsp72

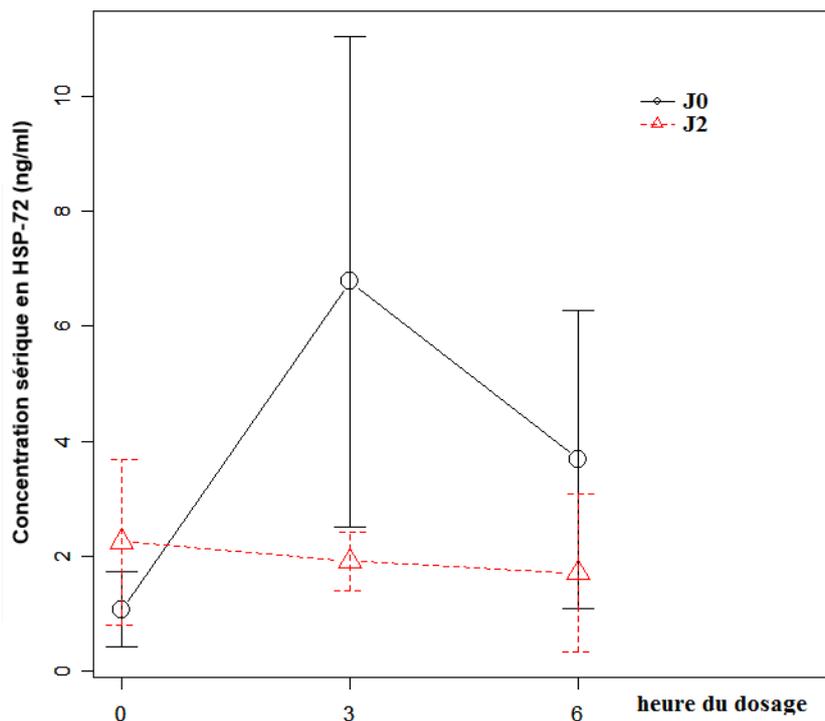


Figure 32 : évolution de la concentration sérique moyenne en Hsp72 à J0 et J2

Les barres représentent l'erreur standard de la moyenne.

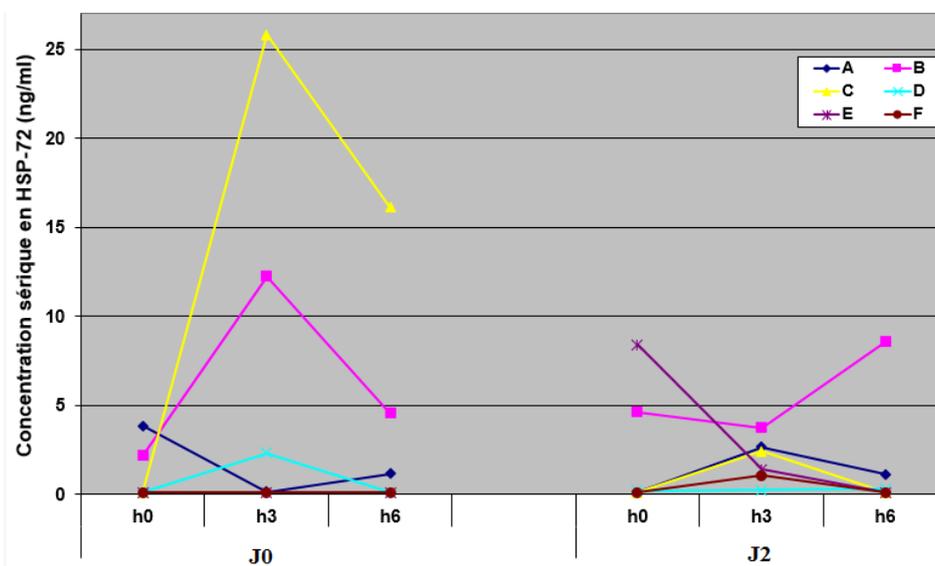


Figure 33 : évolution de la concentration sérique individuelle en Hsp72 au cours du temps

Les variations interindividuelles sont importantes et génèrent des écart-types et des erreurs standards des moyennes très élevés.

L'objectif de l'étude est la recherche d'une différence significative entre les concentrations en Hsp72, IL-6 et TNF- α avant et après complémentation avec le Proteostress équin : il est difficile de déceler une tendance ($p>0,05$, modèle lme). Il y a un léger pic des concentrations sériques individuelles en Hsp72 à h3 (vu sur 3 chevaux à J0 et sur 4 chevaux à J2) (Figure 33) non retrouvé sur la courbe des moyennes (Figure 32).

Les résultats sont moins dispersés à J2, comme si tout le pool de protéines Hsp72 avait été consommé à J0 et qu'il n'avait pas eu le temps de se reformer.

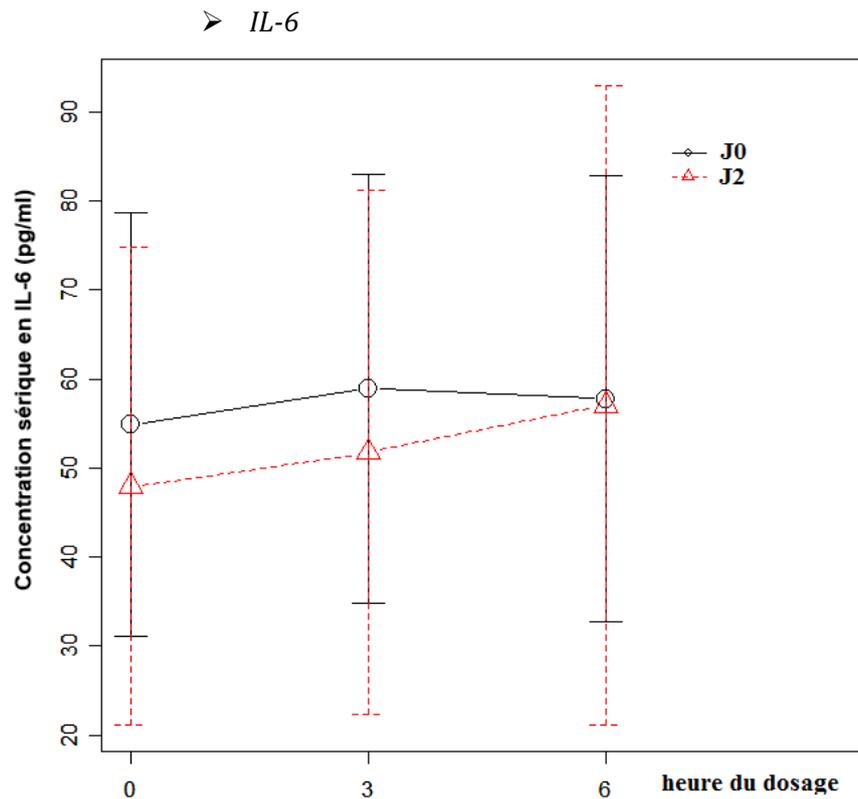


Figure 34 : évolution de la concentration sérique moyenne en IL-6 à J0 et J2

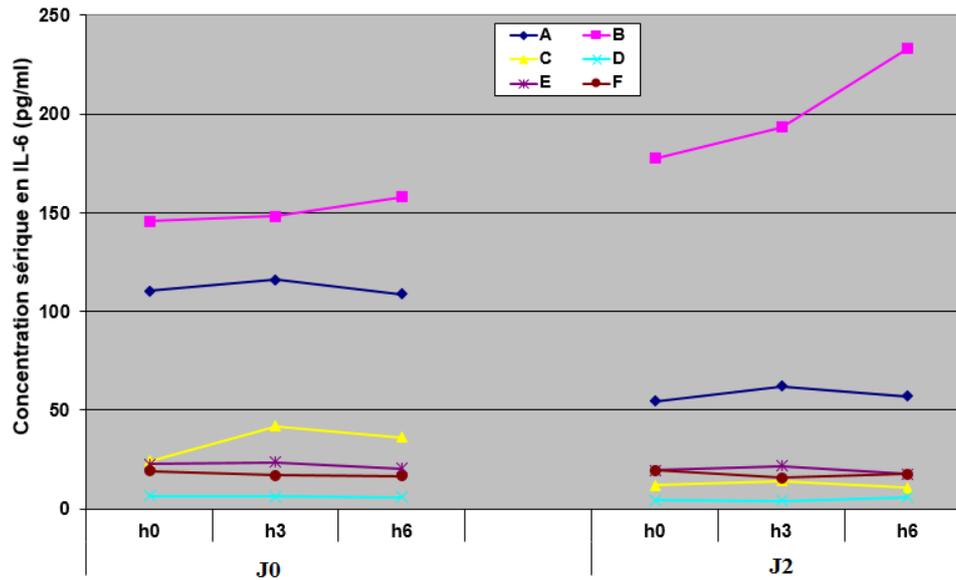


Figure 35 : évolution de la concentration sérique individuelle en IL-6 au cours du temps

Les écart-types sont important et génèrent des erreurs standards des moyennes élevées.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence un impact du Proteostress équin sur la production de IL-6 ($p > 0,05$, modèle lme).

On sait que l'interleukine 6 est produite par les cellules musculaires au cours de l'effort. L'effort à J2 semble avoir été plus intense car la courbe est ascendante entre h0 et h6 sur la Figure 34. Néanmoins, si on regarde les variations individuelles (Figure 35) on se rend compte que le sujet B à lui seul, ayant des concentrations sériques en IL-6 très élevées et ascendantes, fait suivre cette tendance à la courbe des moyennes. Les autres chevaux ont des valeurs plutôt basses et leur courbe n'est pas toujours ascendante.

➤ *TNF- α*

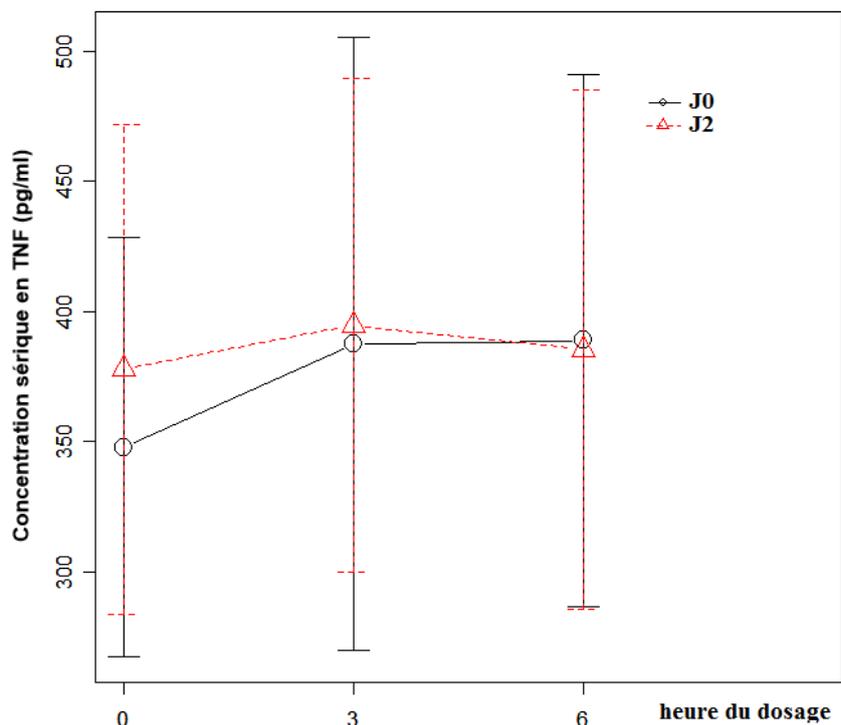


Figure 36 : évolution de la concentration sérique moyenne en TNF- α à J0 et J2

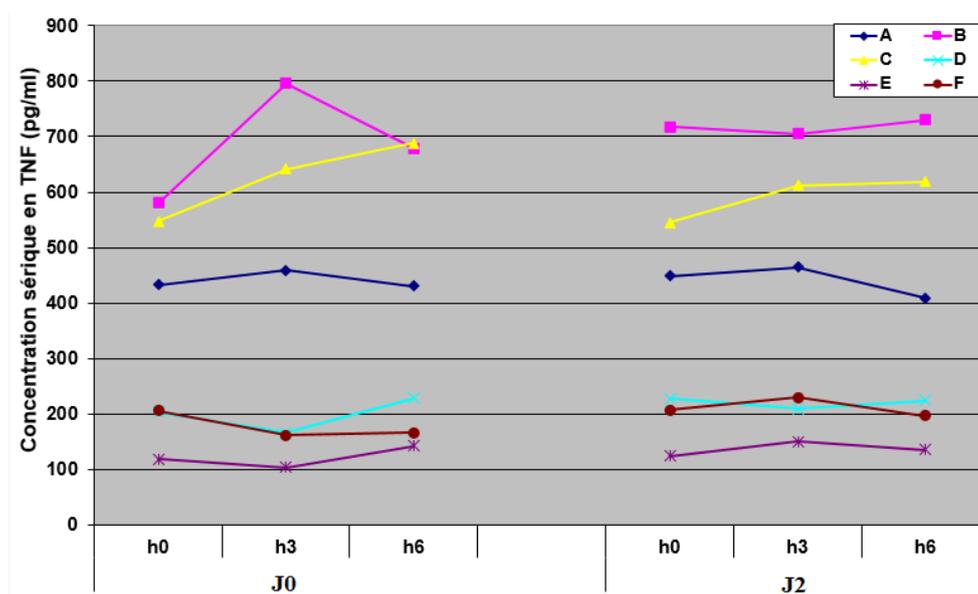


Figure 37 : évolution de la concentration sérique individuelle en TNF- α au cours du temps

Les écart-types sont important et génèrent des erreurs standards des moyennes élevées.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence un impact du Proteostress équin sur la production de TNF- α ($p > 0,05$, modèle lme).

On peut voir deux groupes de chevaux sur la courbe des variations individuelles (Figure 37), les chevaux A, B et C, aux fortes concentrations sériques en TNF- α à J0 et à J2 (supérieures à 400pg/mL) et les chevaux D, E et F, dont les concentrations sériques en TNF- α restent inférieures à 250pg/mL.

Aucune tendance ne paraît se détacher des courbes brutes, les courbes des moyennes le confirment et les écarts-type sont importants.

On ne peut pas conclure à un effet significatif du Proteostress équin sur les concentrations sériques en Hsp72, IL-6 et TNF- α car $p > 0,05$. Il n'y a aucune différence significative entre les valeurs avant et après complémentation pour aucun des trois paramètres suivis.

III) Discussion

A) Etude « dopage »

Les analyses ont été faites au Laboratoire des Courses Hippiques, dont l'activité principale est de traiter les échantillons de sang et d'urine émanant des courses de trot et de galop. Une des activités annexes du LCH est de vérifier l'absence de résidus dopants dans le produit fini de laboratoires privés.

Les résultats de l'étude sont bons. Aucun des chevaux testés n'a montré de résidus dopants après une semaine de traitement à une concentration cinq fois supérieure aux doses recommandées par le fabricant, que ce soit dans le sang ou les urines.

Le Proteostress équin ne produit donc aucun métabolite en concentration assez forte pour être détecté et peut sans problème être administré avant des épreuves sportives importantes.

B) Etude « HSP »

A la lueur des résultats obtenus et du traitement statistique, seule l'hypothèse selon laquelle le Proteostress n'est pas dopant peut être validée. Il n'a pas été possible de conclure que le Proteostress équin augmente la concentration systémique en Hsp72 et entraîne une meilleure réponse au stress cellulaire suite à un exercice physique, et que le Proteostress équin diminue la concentration systémique des marqueurs de l'inflammation IL-6 et TNF- α .

Les résultats de cette étude ne sont pas ceux attendus. On ne trouve aucune différence significative de concentration en Hsp72, TNF- α ou IL-6 après deux jours de supplémentation au Proteostress équin.

Quels sont les biais de cette étude et les erreurs faites dans la préparation du protocole ?

1. Population étudiée

Les chevaux utilisés pour l'étude préclinique sont des Selle-Français bien entraînés, habitués à l'effort demandé lors de l'expérience. On peut imaginer qu'il sera plus difficile pour ces athlètes d'atteindre un niveau de stress suffisant pour que la transcription de HSP soit stimulée. On sait que l'exercice augmente la concentration en HSP dans l'organisme mais qu'il faut une intensité suffisante pour initier la traduction (Pösö et al. 2002). Aucun moyen de contrôle de cette intensité n'a été mis en place : un dosage de la lactatémie et une mesure de la fréquence cardiaque pendant l'exercice auraient pu montrer si cet exercice dépasse respectivement la V_4 et la V_{200} .

V_4 et V_{200} :

- ✓ Le dosage des lactates au cours de l'exercice permet d'établir une courbe de la lactatémie en fonction de vitesse. La V_4 est la vitesse à laquelle la lactatémie atteint 4mmol/L dans l'organisme du cheval. C'est un bon prédicteur de la capacité aérobie.
- ✓ La mesure de la fréquence cardiaque et de la vitesse du cheval athlète pendant l'exercice permet d'établir une courbe de la fréquence cardiaque en fonction de la vitesse. La V_{200} est la vitesse à laquelle le cœur du sportif bat à 200 battements par minute. C'est une indication importante de la capacité métabolique du cheval (Couroucé 2015).

Les six chevaux de l'étude ne forment pas une population homogène, ils n'ont pas le même âge, ni le même sexe. On peut penser qu'un cheval âgé ne réagira pas de la même façon à un exercice de forte intensité : la capacité de ses muscles à répondre à un stress oxydant est moins bonne que chez un sujet jeune mais le stress subi est moins important du fait de son habitude à faire cet exercice (Avenatti 2014; Kinnunen 2011).

Par contre, la population étudiée est homogène en terme d'entraînement car tous ces chevaux ont le même type d'exercice et leur corps est régulièrement sollicité.

2. Protocole

2.i – Durée de l'expérimentation

Le protocole mis en œuvre est très court. En effet, si la durée cumulée des deux études « doping » et « HSP » est supérieure à une semaine, les chevaux reçoivent uniquement deux jours de supplémentation au Proteostress équin avant que l'exercice intense et les prélèvements ne soient effectués.

On peut légitimement penser qu'il faut qu'un complément alimentaire soit pris pendant un certain temps pour qu'un effet soit détectable. Ce n'est pas le cas dans cette expérimentation.

L'administration de vitamine E à forte concentration quelques heures avant l'effort apporte des bénéfices, Rey et al recommandent néanmoins une cure d'une semaine (Rey et al. 2013). Le Proteostress équin (mélange de PORPHYRAL HSP ND et de vitamine E) a été donné seulement pendant deux jours avant l'effort mais à une dose très forte (cinq fois la dose recommandée par le fabricant). Les deux doses données la veille et l'avant-veille de l'effort ont suffi à apporter un effet de protection antioxydant mais il est difficile de savoir s'il sera suffisant pour l'effort demandé.

2.ii – Effort lors du protocole

L'effort effectué n'était peut-être pas assez intense. Le fait d'effectuer un cross et non un test sur tapis et de ne pas doser les lactates ne permet pas de voir si chaque sujet de l'étude a atteint un seuil de fatigue ou au moins la V_4 .

2.iii – Randomisation

Un biais important dans cette étude est l'absence de placebo et de distribution du produit en double aveugle.

Le protocole utilisé utilise un effet croisé car chaque cheval est son propre témoin avant et après complémentation, et avant et après effort. Le fait de répéter les mesures sur le même cheval renforce la puissance des tests statistiques.

Néanmoins, l'étude n'est pas un « vrai » essai croisé car il n'y a qu'une seule période de test.

2.iv – Dose et concentration du produit

Le produit Proteostress équin a été donné à une concentration cinq fois supérieure aux recommandations pour l'étude LCH mais aussi pour l'étude HSP, les concentrations ne sont donc pas les mêmes que celles préconisées sur le packaging.

Il n'y a eu aucun effet significatif du produit sur les concentrations systémiques en Hsp72, IL-6 et TNF- α lors de cette expérience, mais on aurait pu se demander si les résultats obtenus auraient été fiables et reproductibles sur le terrain dans le cas contraire, car le propriétaire n'aurait donné qu'un peu plus d'un tiers de la dose testée (20mL deux fois par jour).

De plus, les chevaux ont eu deux doses de 100mL à J0 et J1, ce n'est sans doute pas assez long pour que l'organisme puisse tirer un réel bénéfice du Proteostress équin. On peut compter sur un effet « boost » antioxydant de la vitamine E mais il est difficile de savoir si le PORPHYRAL HSP ND a pu agir en si peu de temps. Néanmoins, les expériences *in vitro* ont montré que le PORPHYRAL HSP ND n'est capable d'agir que lors d'un stress ; en situation physiologique, le taux de HSP n'est pas augmenté.

Il est également difficile de discerner l'effet de la vitamine E par rapport à celui du PORPHYRAL HSP ND, les deux étant administrés en même temps. Fischer et al affirment que la vitamine E aurait un effet inhibiteur sur la transcription de Hsp70, l'association de la vitamine E et du PORPHYRAL HSP ND ne serait alors pas la plus pertinente (Fischer et al. 2006).

2.v – Répétabilité

L'exercice intense demandé lors de l'épreuve était la réalisation d'un cross de 18 obstacles en un peu plus de 5 minutes.

Néanmoins, l'intensité de l'exercice est difficilement contrôlable et l'effort difficilement reproductible, sauf à tracer exactement le même parcours. Comparativement à une épreuve sur tapis où l'on peut régler à la fois la vitesse et la durée de l'exercice, un tel cross est difficilement standardisable sans aucune mesure de la fréquence cardiaque, des lactates et de la vitesse.

De plus, les chevaux ont été mis dans les conditions d'entraînement à J0 mais dans des conditions de concours à J2.

3. Prélèvements et analyses

Comme dans plusieurs études montrant l'impact d'un complément alimentaire sur le cheval athlète, le substrat sanguin est utilisé comme marqueur de l'inflammation, or il est le reflet du corps entier et pas uniquement des muscles (Liburt et al. 2010).

Dans cette étude, seuls des tests sanguins sont effectués. On peut voir dans la plupart des autres études sur les HSP que des biopsies sont effectuées (Avenatti 2014; Pösö et al. 2002; Kinnunen et al. 2005; Kinnunen et al. 2009; van Ginneken et al. 2006). Dans ce cas, l'administration et la clinique vétérinaire de l'ENE n'ont pas autorisé le prélèvement musculaire via des biopsies sur les chevaux de l'ENE.

Febbraio et al affirment néanmoins que les HSP ne sont pas produites uniquement par les cellules stressées lors d'exercice mais aussi par d'autres organes comme le foie. Ces HSP sont alors libérées dans la circulation systémique en réponse à une stimulation musculaire et sont des marqueurs du stress induit par la baisse de glycogène dans les muscles (Febbraio et al. 2002).

La plupart des études faites sur la variation de la concentration sérique et musculaire des HSP lors d'exercice physique allient le sang et la biopsie.

La décision de faire des tests ELISA à la place du dosage d'ARN a été motivée par la rupture de stock de tubes PAXgène chez le fabricant. Malheureusement, le schéma de prélèvement qui avait été décidé pour doser les ARNm apparaissant peu de temps après l'effort était impossible à modifier pour des contraintes logistiques et seuls deux prélèvements ont été faits après l'effort. Le test ELISA dosant les protéines, il est difficile de le trouver pertinent sachant qu'en 3 à 6h il est ardu de voir une différence dans le taux de protéines. Febbraio affirme que l'exercice de forte intensité augmente l'expression de *hsp72* ou de la protéine 120 à 140 minutes après le début de l'exercice, mais cette augmentation a lieu dans le muscle et non dans la circulation systémique (Febbraio et al. 2002; Febbraio et Koukoulas 2000).

Dans cette étude préclinique, seuls Hsp72, IL-6 et TNF- α ont été dosés. D'autres protéines auraient pu être quantifiées, comme les lactates (Pösö trouve une corrélation entre la lactatémie et l'ARNm de Hsp72) (Pösö et al. 2002), les CK (Defontis, Richard, et Pitel 2013), ou le cortisol (Avenatti 2014), dont l'augmentation signe une souffrance musculaire lors de l'effort.

Il ne faut pas oublier de prendre en compte de possibles erreurs pré-analytiques dues à la dégradation des marqueurs sous la lumière, la chaleur ou l'oxygène (Defontis, Richard, et Pitel 2013).

4. Comparaison des résultats de cette étude à la bibliographie

La plupart des études déjà faites sur le sujet ont été faites sur des trotteurs (Avenatti 2014; Kinnunen et al. 2005; Kinnunen et al. 2009; Liburt et al. 2010; Leleu et al. 2013; Pösö et al. 2002) ou chez l'homme (Fischer et al. 2006; Puntschart et al. 1996; Morton, Kayani, et al. 2009).

Cette étude utilise des chevaux de CCE et l'exercice (le cross) est difficile à quantifier comparé à un travail sur tapis. Les comparaisons de ces résultats avec ceux d'autres études peuvent être discutables mais c'est néanmoins ce qui sera fait dans cette partie.

4.i Hsp72

Avenatti montre une augmentation de Hsp70 dans le sang total pour les jeunes et les chevaux âgés après un exercice intense mais l'augmentation est bien plus marquée (3 fois plus) chez les jeunes sujets. Cela montre une habitude des cellules musculaires à l'entraînement chez les sujets plus âgés, le taux de HSP constitutives est plus élevé et le seuil à atteindre pour déclencher la production de nouvelles protéines est aussi plus élevé. Néanmoins, les sujets les plus âgés répondent moins bien et moins vite au stress induit par un exercice physique pour augmenter leur taux de HSP. Il montre également que l'augmentation de l'ARNm n'est pas toujours suivie d'une augmentation en protéines (Avenatti 2014).

Les résultats de Kinnunen et al ne vont pas dans le même sens et montrent qu'un exercice modéré pendant 45 minutes n'active pas HSF1 ni n'induit l'expression de Hsp70 dans le muscle malgré le stress oxydant et l'inflammation tissulaire. Les sujets utilisés sont bien entraînés et l'exercice mis en place n'est sans doute pas assez intense pour déclencher la production de HSP 4h post-effort (Kinnunen et al. 2005).

Morton et al, de même, montrent que les individus entraînés ne déclenchent pas de réponse à l'exercice : l'entraînement a augmenté le seuil homéostatique à partir duquel la réponse en HSP est déclenchée. Les résultats montrent qu'il y a une augmentation de la transcription pendant ou après l'exercice mais les protéines ne sont pas détectables avant un ou deux jours post-effort (Morton, Kayani, et al. 2009). Ceci pourrait expliquer pourquoi aucune augmentation de Hsp72 n'est détectée dans le sang des sujets à 3 et 6h post-effort.

Fischer et al concluent que l'exercice quel qu'il soit augmente la transcription de l'ARNm de Hsp72 mais que seul un exercice intense avec une composante excentrique (et donc des dommages créés au muscle) augmente le taux protéique de Hsp72 (Fischer et al. 2006). De même, Pösö considère qu'un entraînement modéré effectué de manière continue augmente l'expression de l'ARNm de Hsp72.

Chez Puntchart et al, l'augmentation d'ARNm de Hsp72 n'est pas suivie d'expression de la protéine 3h après le pic (Puntchart et al. 1996).

Dans cette étude, les sujets sont très entraînés et habitués à des efforts aussi intenses que ceux demandés pendant l'expérience. Plusieurs d'entre eux avaient des concentrations sériques en Hsp72 inférieures à la limite de détection. Cela apporte un éclairage différent sur l'échec de cette étude à montrer une augmentation de Hsp72 dans la circulation sanguine.

D'une part, l'absence de dosage des ARNm dans la circulation sanguine ne permet pas de savoir si l'effort demandé a entraîné une hausse du taux d'ARNm de Hsp72. Il a pu y avoir une augmentation de l'ARNm non suivie d'une augmentation du nombre de protéines.

D'autre part, l'absence de biopsie ne permet pas non plus de savoir si l'effort a été suffisant pour que Hsp72 soit transcrite dans la cellule musculaire.

De plus, les auteurs ayant dosé les ARNm n'obtiennent pas de consensus sur la stimulation des HSP par l'exercice (Pösö et al. 2002; Kinnunen et al. 2009). Avenatti suppose que ces divergences sont dues aux méthodes semi-quantitatives de mesure de l'ARNm, qui montrent de grandes variations individuelles dans la réponse HSP (Avenatti 2014).

4.ii IL-6 et TNF- α

Avenatti compare des sujets jeunes et âgés (Standardbred sur tapis) et analyse certaines cytokines, dont IL-6 et TNF- α . Les concentrations de ces deux cytokines restent inchangées dans le sang ou le muscle quel que soit l'exercice (Avenatti 2014).

Leleu et al montrent également que les concentrations en TNF- α et IL-6 ne sont pas significativement modifiées après l'exercice (Trotteurs Français sur tapis), néanmoins les jeunes chevaux présentent des valeurs en IL-6 plus élevées que les chevaux âgés (Leleu et al. 2013).

Cela correspond aux résultats obtenus dans cette étude, où les valeurs de IL-6 et TNF- α ne sont pas significativement différentes avant et après exercice, avec ou sans complémentation avec le Proteostress équin. Aucune différence n'est visible entre les sujets les plus jeunes et les plus âgés mis à part des valeurs en TNF- α plus hautes pendant toute l'étude pour 3 chevaux parmi les plus âgés ; il est néanmoins difficile de faire des statistiques sur une population si petite.

Liburt et al trouvent un pic d'ARNm de TNF- α 6h après exercice et une augmentation de l'ARNm de IL-6 dans le muscle mais pas dans le sang (Liburt et al. 2010). Il est impossible de voir ce pic pour deux raisons : les ARNm n'ont pas été dosés et si le pic a bien lieu, les protéines sont formées plus tard et les mesures n'ont été faites que 3 et 6h après exercice.

Cette étude pré-clinique, si elle n'a pas eu les résultats escomptés, met en évidence les biais à éviter lors des prochaines expériences. Un protocole d'essai croisé avec deux périodes d'exercice standardisé, ainsi que des mesures de l'ARNm de Hsp72 dans le sang et dans le muscle avec une population plus grande, seraient préférables.

De plus, il est nécessaire d'accorder une grande attention au choix de la population d'étude. Dans un souci de standardisation, l'utilisation d'une population de chevaux non entraînés pourrait être préférable. De même, un exercice sur tapis à grande vitesse permet de mieux standardiser l'effort.

Un contrôle de la variation de la lactatémie et le suivi de la fréquence cardiaque lors de l'exercice permettraient alors de qualifier l'intensité de l'exercice. La mesure d'autres paramètres sanguins, comme les CK, la SOD et la GPx, permettrait de mieux qualifier l'inflammation du muscle et son niveau de stress oxydant.

CONCLUSION

Malgré de récentes avancées dans la recherche en biologie cellulaire, les rôles joués par les cytokines et certains schémas de signalisation restent encore seulement partiellement compris.

IL-6 n'a plus le rôle pro-inflammatoire qu'on lui a longtemps donné, mais est aujourd'hui considérée comme une cytokine aux effets pro- et anti-inflammatoire. Ses nombreuses interventions dans différents schémas de signalisation rendent sa qualification complexe et l'utilisation d'anticorps spécifiques difficile.

TNF- α , lui aussi longtemps considéré comme la molécule pro-inflammatoire par excellence, possède un rôle plus large. Les derniers échecs dans l'utilisation d'anticorps tournés contre TNF- α lors de certaines maladies montrent que cela n'est pas aussi simple car TNF- α intervient à de nombreux niveaux dans le métabolisme.

Les HSP, dans leur forme constitutive, régissent à la fois l'homéostasie de la cellule, sa survie et son apoptose. Leur rôle de « protéines chaperons » est extrêmement important, cependant ce n'est pas leur seule fonction. Les nombreuses interventions des HSP dans la vie de la cellule, que ce soit au niveau immunitaire ou lors de cancers montrent la richesse de leur potentiel. Sous l'action d'un stress, la forme inductible des HSP est transcrite et vient au secours de la cellule. Le stress oxydant, montré du doigt de manière virulente par l'industrie agro-alimentaire, ne serait alors pas si mauvais, permettant à la cellule de mettre en place des stratégies de protection et de tolérance de certaines lésions, boostant ses défenses anti-oxydantes.

L'étude bibliographique de ces différentes cytokines et protéines met en évidence la complexité des interactions et l'étendue de ce qu'il reste encore à découvrir. Cela impacte bien entendu la réalisation d'une étude expérimentale, rendant l'interprétation des résultats moins facile.

Cette étude expérimentale trouve une limitation dans la difficulté de caractériser l'intensité de l'effort physique fourni par la population choisie (chevaux entraînés travaillant régulièrement au même niveau d'exercice). De plus, la rupture de stock du fournisseur de tubes PAXgène survenue juste avant les expériences ne permet pas de doser et donc de mettre en évidence de potentiels ARNm survenant dans les 6 heures post-effort.

Il faut également se demander si IL-6 et TNF- α étaient les marqueurs les plus probants dans le cas de cette étude et de ce protocole. Ainsi, l'impossibilité d'obtenir une différence significative de concentration sériques en cytokines avant et après effort, que ce soit avec ou sans Proteostress équin, témoigne de schémas de signalisation complexes et intervenant à différents niveaux dans l'homéostasie de l'organisme faisant un exercice intense, brouillant les pistes dans la qualification des résultats obtenus.

Si ce travail de thèse échoue à conclure que le PORPHYRAL HSP ND est un ingrédient qui augmente la concentration systémique en Hsp72 comme démontré *in vitro*, l'aspect non-dopant de cet ingrédient a néanmoins été prouvé, et c'est un point indispensable à sa future utilisation sur des chevaux de sport et de course.

Cette étude et ce travail de thèse auront été très enrichissants. En effet, la réussite d'une étude tient dans la construction d'un bon protocole et le travail de chercheur passe par des essais infructueux

et des erreurs qui permettent d'avancer. Cet aperçu du quotidien de chercheur est très formateur. De plus, cette étude sera une étude pilote pour de nouvelles expériences avec le PORPHYRAL HSP ND.

Les HSP jouent un rôle très important dans le mécanisme de la réponse au stress, et la richesse de la bibliographie met en lumière les nombreuses occasions au cours desquelles le métabolisme utilise des HSP. Leur ubiquité leur confère de nombreuses fonctions dans l'organisme, et leurs implications lors de coliques, de chirurgies, mais aussi dans les mécanismes l'immunité, méritent d'être étudiées.

Annexes

Annexe 1

Hsp70 : utilisation du kit de haute sensibilité ADI-EKS-715 de Enzo Life Sciences

- 1 – Mettre l'échantillon (sérum ou plasma) à incuber dans les puits recouverts d'Ac anti-Hsp70.
- 2 – Laver les puits, seules les Hsp70 liées aux Ac sont conservées. Ajout d'une solution d'Ac polyclonaux spécifiques à Hsp70, qui vont se lier aux Hsp70 restant dans les puits.
- 3 – Deuxième lavage, pour enlever les Ac polyclonaux en excès. Ajout d'une solution de conjugué enzymatique HRP dans chaque puit, le conjugué se lie aux Ac. Incubation.
- 4 – Lavage pour retirer l'excès de conjugué. Ajout d'une solution de substrat chromogène TMB qui génère une couleur bleue une fois oxydé par l'enzyme HRP.
- 5 – Ajout d'une solution « stop » pour arrêter la réaction précédente et lecture à 450nm (l'intensité du signal est directement proportionnelle à la quantité de Hsp70 de l'échantillon).

Annexe 2

TNF- α : utilisation du kit de développement ELISA DuoSet DY1814 de R&D Systems

IL-6 : principe et kit identique et de la même société, n'est plus commercialisé aujourd'hui

- 1 – Mélanger 100 μ L d'échantillon avec le tampon de dilution et le déposer dans les puits. Laisser incuber 2h à température ambiante.
- 2 – Laver et ajouter 100 μ L d'une solution d'Ac dilués dans le tampon de dilution. Laisser incuber 2h à température ambiante.
- 3 – Laver et ajouter 100 μ L de solution de HRP dans chaque puit. Laisser incuber 20 minutes.
- 4 – Laver et ajouter 100 μ L de solution substrat dans chaque puit.
- 5 – Ajouter 50 μ L de solution « stop ». Lecture à 450nm et comparaison à la courbe étalon pré-établie.

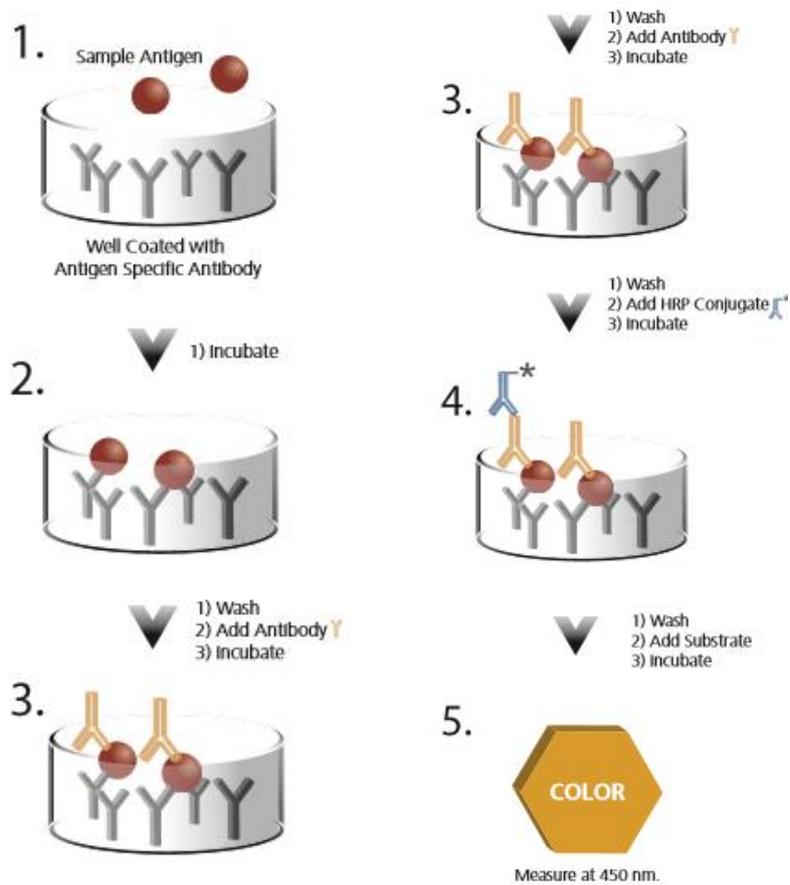


Figure 38 : schéma illustrant le mécanisme de l'ELISA sandwich - issu du manuel d'utilisation du kit Enzo Life Sciences

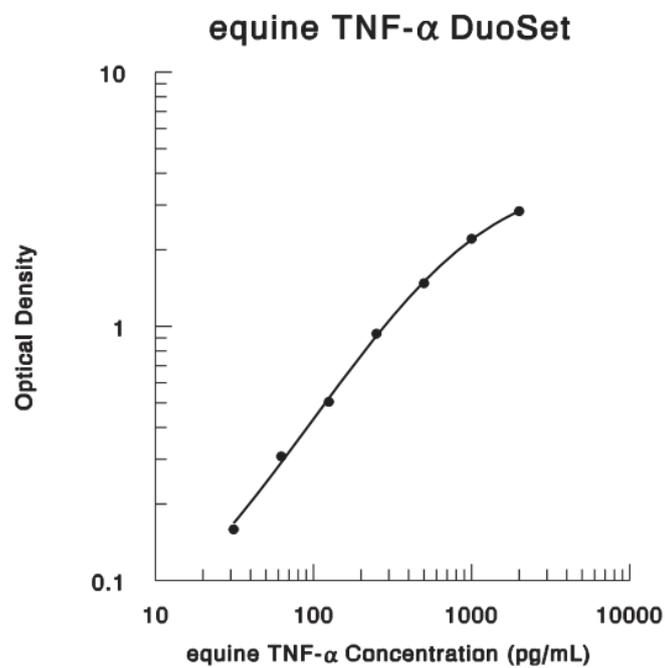


Figure 39 : exemple de courbe étalon pour la lecture de la concentration en TNF- α - issu du manuel d'utilisation du kit R&D Systems

Annexe 3

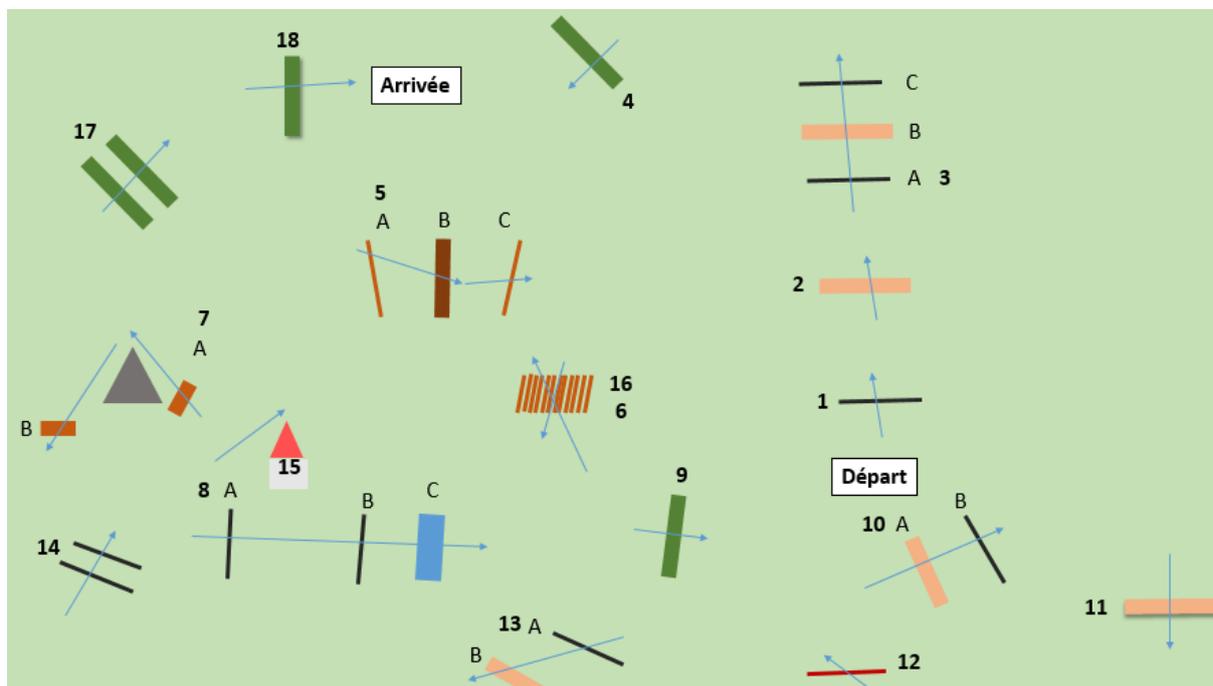


Figure 40 : tracé du parcours de cross

Annexe 4

Tableau 11 : liste des obstacles du cross

1	Trakehner
2	Banc
3 A B C	Saut de puce
4	Bull finch
5 A B C	Coffin
6	Palissade
7 A B	Chapeau de gendarme
8 A B C	Gué
9	Haie
10 A B	Combinaison
11	Panoramique
12	Trakehner
13 A B	Combinaison
14	Oxer
15	Maison
16	Palissade
17	Oxer de haies
18	Haie

Annexe 5

Tableau 12 : concentrations sériques en Hsp72, IL-6 et TNF- α au cours du temps pour chaque sujet

Nom du cheval	Jours de l'effort	Heure du dosage	TNF alpha	IL-6	Hsp72
A	0	0	433	110,55	3,86
A	0	3	458	116,26	0,13
A	0	6	431	108,95	1,16
A	2	0	449	54,58	0,1
A	2	3	464	61,91	2,66
A	2	6	408	57,21	1,14
B	0	0	581	145,90	2,18
B	0	3	795	148,31	12,25
B	0	6	679	157,80	4,53
B	2	0	718	177,40	4,63
B	2	3	704	193,10	3,71
B	2	6	730	232,94	8,55
C	0	0	547	24,10	0,1
C	0	3	642	41,76	25,8
C	0	6	688	36,41	16,12
C	2	0	545	12,27	0,1
C	2	3	612	13,97	2,41
C	2	6	619	10,58	0,1
D	0	0	203	6,45	0,1
D	0	3	166	6,21	2,29
D	0	6	228	6,06	0,1
D	2	0	228	4,31	0,17
D	2	3	210	3,90	0,22
D	2	6	224	6,07	0,28
E	0	0	118	22,67	0,1
E	0	3	103	23,56	0,1
E	0	6	142	20,64	0,1
E	2	0	123	19,43	8,42
E	2	3	149	21,76	1,41
E	2	6	136	17,61	0,1
F	0	0	206	19,22	0,1
F	0	3	162	17,26	0,1
F	0	6	165	16,65	0,1
F	2	0	206	19,41	0,1
F	2	3	229	15,66	1,07
F	2	6	196	17,81	0,1

Annexe 6

Script de R : utilisation des données brutes du Tableau 11

```
library(nlme)
library(multcomp)
names(Jour0)

TNF.alpha.lme0<-lme(TNF.alpha~Heure2,Jour0,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(TNF.alpha.lme0)
qqnorm(TNF.alpha.lme0)
summary(glht(TNF.alpha.lme0,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

IL.6.lme0<-lme(IL.6~Heure2,Jour0,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(IL.6.lme0)
qqnorm(IL.6.lme0)
summary(glht(IL.6.lme0,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

Hsp72.lme0<-lme(Hsp72~Heure2,Jour0,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(Hsp72.lme0)
qqnorm(Hsp72.lme0)
summary(glht(Hsp72.lme0,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

names(Jour2)

TNF.alpha.lme<-lme(TNF.alpha~Heure2,Jour2,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(TNF.alpha.lme)
qqnorm(TNF.alpha.lme)
summary(glht(TNF.alpha.lme,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

IL.6.lme<-lme(IL.6~Heure2,Jour2,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(IL.6.lme)
qqnorm(IL.6.lme)
summary(glht(IL.6.lme,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

Hsp72.lme<-lme(Hsp72~Heure2,Jour2,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(Hsp72.lme)
qqnorm(Hsp72.lme)
summary(glht(Hsp72.lme,linfct = mcp(Heure2 = "Tukey")))

TNF.alphaC.lme<-
lme(TNF.alpha~Heure.du.dosage*Traitement,Proteostress,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(TNF.alphaC.lme)

TNF.alphaC.lme2<-lme(TNF.alpha~Heure2*Traitement,Proteostress,random=~1 | Nom.du.cheval)

summary(TNF.alphaC.lme2)
```

```
plotMeans(Proteostress$TNF.alpha, Proteostress$Heure2, Proteostress$Traitement, error.bars="se")
IL.6C.lme<-lme(IL.6~Heure.du.dosage*Traitement,Proteostress,random=~1|Nom.du.cheval)
summary(IL.6C.lme)
plotMeans(Proteostress$IL.6, Proteostress$Heure2, Proteostress$Traitement, error.bars="se")
Hsp72C.lme<-lme(Hsp72~Heure.du.dosage*Traitement,Proteostress,random=~1|Nom.du.cheval)
summary(Hsp72C.lme)
plotMeans(Proteostress$Hsp72, Proteostress$Heure2, Proteostress$Traitement, error.bars="se")
```

BIBLIOGRAPHIE

- Alcaraz, Maria Jose, Oreste Gualillo, et Olga Sanchez-Pernaute. 2013. *Studies on arthritis and joint disorders*. Oxidative stress in applied basic research and clinical practice. Humana Press.
- Arrigo, André-Patrick. 2005. « Chaperons moléculaires et repliement des protéines : L'exemple de certaines protéines de choc thermique ». *médecine/sciences* 21 (6-7): 619-25. doi:10.1051/medsci/2005216-7619.
- Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo, et S. K. Calderwood. 2000. « HSP70 Stimulates Cytokine Production through a CD14-Dependant Pathway, Demonstrating Its Dual Role as a Chaperone and Cytokine ». *Nature Medicine* 6 (4): 435-42. doi:10.1038/74697.
- Avenatti, Ryan, Charles. 2014. « Effects of age and acute submaximal exercise on inflammatory cytokines, cortisol, insulin, heat shock proteins and skeletal muscle mediators of energy homeostasis in horses ». Rutgers, The State University of New Jersey.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, et P. K. Srivastava. 2000. « Necrotic but Not Apoptotic Cell Death Releases Heat Shock Proteins, Which Deliver a Partial Maturation Signal to Dendritic Cells and Activate the NF-Kappa B Pathway ». *International Immunology* 12 (11): 1539-46.
- Baugh, John A, et Richard Bucala. 2001. « Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease ». *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 4 (5): 635-50.
- Binder, R. J., N. E. Blachere, et P. K. Srivastava. 2001. « Heat Shock Protein-Chaperoned Peptides but Not Free Peptides Introduced into the Cytosol Are Presented Efficiently by Major Histocompatibility Complex I Molecules ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (20): 17163-71. doi:10.1074/jbc.M011547200.
- Butler, P. J., A. J. Woakes, K. Smale, C. A. Roberts, C. J. Hillidge, D. H. Snow, et D. J. Marlin. 1993. « Respiratory and Cardiovascular Adjustments during Exercise of Increasing Intensity and during Recovery in Thoroughbred Racehorses ». *The Journal of Experimental Biology* 179 (juin): 159-80.
- Cabrera, Natalia, Agnes Duquesne, Marine Desjonquères, Jean-Paul Larbre, Jean-Christophe Lega, Nicole Fabien, et Alexandre Belot. 2016. « Tocilizumab in the Treatment of Mixed Connective Tissue Disease and Overlap Syndrome in Children ». *RMD Open* 2 (2): e000271. doi:10.1136/rmdopen-2016-000271.
- Couroucé, Anne. 2015. « La médecine sportive appliquée au cheval athlète ». présenté à Cours de cinquième année, Oniris.
- Crile, G. 1963. « The Effects of Heat and Radiation on Cancers Implanted on the Feet of Mice ». *Cancer Research* 23 (mars): 372-80.
- Csordás, György, et György Hajnóczky. 2009. « SR/ER-Mitochondrial Local Communication: Calcium and ROS ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (11): 1352-62. doi:10.1016/j.bbabi.2009.06.004.
- De Moffarts, B., N. Kirschvink, J. Pincemail, et P. Lekeux. 2005. « Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval ». *Annales de médecine vétérinaire* 149: 1-9.
- Defontis, Myriam, Eric Richard, et Pierre-Hugues Pitel. 2013. « Comment objectiver l'équilibre oxydatif chez le cheval athlète ? » In , 6-10. Cabourg: Société Française des Antioxydants.
- Dubois, Benjamin, Jean-Jacques Thiébault, Université Claude Bernard (Lyon), et VetAgro Sup. 2015. « L' implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète: revue bibliographique ». S.l.: [s.n.].

- Febbraio, M. A., et I. Koukoulas. 2000. « HSP72 Gene Expression Progressively Increases in Human Skeletal Muscle during Prolonged, Exhaustive Exercise ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 89 (3): 1055-60.
- Febbraio, M. A., S. Rose-John, et B. K. Pedersen. 2010. « Is Interleukin-6 Receptor Blockade the Holy Grail for Inflammatory Diseases? » *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 87 (4): 396-98. doi:10.1038/clpt.2010.1.
- Febbraio, Mark A., et Bente Klarlund Pedersen. 2002. « Muscle-Derived Interleukin-6: Mechanisms for Activation and Possible Biological Roles ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (11): 1335-47. doi:10.1096/fj.01-0876rev.
- Febbraio, Mark A., Adam Steensberg, Rory Walsh, Irene Koukoulas, Gerrit van Hall, Bengt Saltin, et Bente Klarlund Pedersen. 2002. « Reduced Glycogen Availability Is Associated with an Elevation in HSP72 in Contracting Human Skeletal Muscle ». *The Journal of Physiology* 538 (Pt 3): 911-17.
- Fehrenbach, E., A. M. Niess, R. Veith, H. H. Dickhuth, et H. Northoff. 2001. « Changes of HSP72-Expression in Leukocytes Are Associated with Adaptation to Exercise under Conditions of High Environmental Temperature ». *Journal of Leukocyte Biology* 69 (5): 747-54.
- Fischer, Christian P., Natalie J. Hiscock, Samar Basu, Bengt Vessby, Anders Kallner, Lars-Börje Sjöberg, Mark A. Febbraio, et Bente K. Pedersen. 2006. « Vitamin E Isoform-Specific Inhibition of the Exercise-Induced Heat Shock Protein 72 Expression in Humans ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 100 (5): 1679-87. doi:10.1152/jappphysiol.00421.2005.
- Frankenberger, M., T. Sternsdorf, H. Pechumer, A. Pforte, et H. W. Ziegler-Heitbrock. 1996. « Differential Cytokine Expression in Human Blood Monocyte Subpopulations: A Polymerase Chain Reaction Analysis ». *Blood* 87 (1): 373-77.
- Freeman, M. L., M. J. Borrelli, K. Syed, G. Senisterra, D. M. Stafford, et J. R. Lepock. 1995. « Characterization of a Signal Generated by Oxidation of Protein Thiols That Activates the Heat Shock Transcription Factor ». *Journal of Cellular Physiology* 164 (2): 356-66. doi:10.1002/jcp.1041640216.
- Fuster, José J., Silvia M. Sanz-González, Ute M. Moll, et Vicente Andrés. 2007. « Classic and Novel Roles of p53: Prospects for Anticancer Therapy ». *Trends in Molecular Medicine* 13 (5): 192-99. doi:10.1016/j.molmed.2007.03.002.
- Gadient, Reto A., et Uwe H. Otten. 1997. « Interleukine-6 (il-6) - a molecule with both beneficial and destructive potentials ». *Progress in Neurobiology* 52: 379-90.
- Geor, R. J., L. J. McCutcheon, G. L. Ecker, et M. I. Lindinger. 1995. « Thermal and Cardiorespiratory Responses of Horses to Submaximal Exercise under Hot and Humid Conditions ». *Equine Veterinary Journal. Supplement*, n° 20 (novembre): 125-32.
- Ginneken, Mireille M. E. van, Ellen de Graaf-Roelfsema, Hans A. Keizer, Klien G. van Dam, Inge D. Wijnberg, Johannes H. van der Kolk, et Eric van Breda. 2006. « Effect of Exercise on Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, c-Jun NH2 Terminal Kinase, and Heat Shock Protein 27 in Equine Skeletal Muscle ». *American Journal of Veterinary Research* 67 (5): 837-44. doi:10.2460/ajvr.67.5.837.
- Gruss, H.-J. s. d. « Molecular, Structural, and Biological Characteristics of the Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily ». *International Journal of Clinical and Laboratory Research* 26 (3): 143-59. doi:10.1007/BF02592977.
- Halliwell, Barry. 2012. « The antioxidant paradox: less paradoxical now? » *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (3): 637-44. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x.
- Halliwell, Barry, et John M. C. Gutteridge. 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth Edition. Oxford University Press.
- Hargitai, Judit, Hannah Lewis, Imre Boros, Tímea Rácz, András Fiser, István Kurucz, Ivor Benjamin, et al. 2003. « Bimoclolol, a Heat Shock Protein Co-Inducer, Acts by the Prolonged Activation of Heat Shock Factor-1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307 (3): 689-95.

- Heinrich, Peter C., Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M. Hermanns, Gerhard Müller-Newen, et Fred Schaper. 2003. « Principles of Interleukin (IL)-6-Type Cytokine Signalling and Its Regulation ». *The Biochemical Journal* 374 (Pt 1): 1-20. doi:10.1042/BJ20030407.
- Henrotin, Y. E., P. Bruckner, et J.-P. L. Pujol. 2003. « The Role of Reactive Oxygen Species in Homeostasis and Degradation of Cartilage ». *Osteoarthritis and Cartilage* 11 (10): 747-55.
- Hodgson, David R, Kenneth Harrington McKeever, et Catherine M McGowan. 2014. *The athletic horse: Principles and practice of equine sports medicine*. Second Edition. Elsevier Saunders.
- Hunter, Christopher A, et Simon A. Jones. 2015. « IL-6 as a keystone cytokine in health and disease ». *Nature immunology* 16 (5): 448-57.
- Javadpour, M., C. J. Kelly, G. Chen, et D. J. Bouchier-Hayes. 1998. « Herbimycin-A Attenuates Ischaemia-Reperfusion Induced Pulmonary Neutrophil Infiltration ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 16 (5): 377-82.
- Jayakumar, J., K. Suzuki, M. Khan, R. T. Smolenski, A. Farrell, N. Latif, O. Raisky, et al. 2000. « Gene Therapy for Myocardial Protection: Transfection of Donor Hearts with Heat Shock Protein 70 Gene Protects Cardiac Function against Ischemia-Reperfusion Injury ». *Circulation* 102 (19 Suppl 3): III302-306.
- Johnson, Kylee. 2006. « Effects of vitamin E supplementation on oxidative stress parameters measured in exercising horses ». University of Florida.
- Jolly, Caroline, et Richard I. Morimoto. 2000. « Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death ». *Journal of the National Cancer Institute* 92 (19): 1564-72. doi:10.1093/jnci/92.19.1564.
- Jones, Simon A. 2005. « Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (6): 3463-68.
- Khassaf, M., A. McArdle, C. Esanu, A. Vasilaki, F. McArdle, R. D. Griffiths, D. A. Brodie, et M. J. Jackson. 2003. « Effect of Vitamin C Supplements on Antioxidant Defence and Stress Proteins in Human Lymphocytes and Skeletal Muscle ». *The Journal of Physiology* 549 (Pt 2): 645-52. doi:10.1113/jphysiol.2003.040303.
- Kinnunen, Susanna. 2011. « Oxidative stress in skeletal muscle after acute exercise ». University of Eastern Finland.
- Kinnunen, Susanna, Seppo Hyyppä, Jani Lappalainen, Niku Oksala, Mika Venojärvi, Chitose Nakao, Osmo Hänninen, Chandan K. Sen, et Mustafa Atalay. 2005. « Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters ». *European Journal of Applied Physiology* 93: 496-501. doi:10.1007/s00421-004-1162-x.
- Kinnunen, Susanna, Seppo Hyyppä, Niku Oksala, D. E. Laaksonen, M.-L. Hannila, Chandan K. Sen, et Mustafa Atalay. 2009. « Alpha-lipoic acid supplementation enhances heat shock protein production and decreases post exercise lactic acid concentrations in exercised standardbred trotters ». *Research in Veterinary Science* 87: 462-67.
- Kirschvink, Nathalie. 2013. « Stress oxydant chez le cheval : qu'és aquo ? » In , 3-5. Cabourg: Société Française des Antioxydants.
- Ksontini, R., S. L. MacKay, et L. L. Moldawer. 1998. « Revisiting the Role of Tumor Necrosis Factor Alpha and the Response to Surgical Injury and Inflammation ». *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 133 (5): 558-67.
- Leleu, Claire, Eléonore Aubry, Didier Serteyn, et Helen Warren. 2013. « Réponse inflammatoire à l'exercice chez le cheval trotteur : cinétique de nouveaux marqueurs ». In , 43. Cabourg: Société Française des Antioxydants.
- Li, Ning, Sergei I. Grivennikov, et Michael Karin. 2011. « The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape the Cancer Microenvironment ». *Cancer Cell* 19 (4): 429-31. doi:10.1016/j.ccr.2011.03.018.

- Liburt, N. R., A. A. Adams, A. Betancourt, D. W. Horohov, et Ken Harrington McKeever. 2010. « Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses ». *Equine Veterinary Journal. Supplement 38* 42: 280-88. doi:10.1111/j.2042-3306.2010.00275.x.
- LoCicero, Joseph, Xiangjun Xu, et Lihua Zhang. 1999. « Heat shock protein suppresses the senescent lung cytokine response to acute endotoxemia - The Annals of Thoracic Surgery ». Poster Session présenté à Thirty-fifth Annual Meeting of The Society of Thoracic Surgeons, San Antonio. [http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(99\)00919-4/abstract](http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(99)00919-4/abstract).
- Marini, Marina, et Arsenio Veicsteinas. 2010. « The Exercised Skeletal Muscle: A Review ». *European Journal of Translational Myology* 20 (3): 105-20. doi:10.4081/ejtm.2010.1807.
- McArdle, A., D. Pattwell, A. Vasilaki, R. D. Griffiths, et M. J. Jackson. 2001. « Contractile Activity-Induced Oxidative Stress: Cellular Origin and Adaptive Responses ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 280 (3): C621-627.
- Milne, Kevin J., et Earl G. Noble. 2002. « Exercise-Induced Elevation of HSP70 Is Intensity Dependent ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 93 (2): 561-68. doi:10.1152/jappphysiol.00528.2001.
- Moquet, Pierre. 2016. « Introduction to immunology ». Manimal and Wageningen UR.
- Morimoto, R. I. 1998. « Regulation of the Heat Shock Transcriptional Response: Cross Talk between a Family of Heat Shock Factors, Molecular Chaperones, and Negative Regulators ». *Genes & Development* 12 (24): 3788-96.
- Morton, James P., Kathryn Holloway, Paul Woods, Nigel T. Cable, Jatin Burniston, Louise Evans, Anna C. Kayani, et Anne McArdle. 2009. « Exercise Training-Induced Gender-Specific Heat Shock Protein Adaptations in Human Skeletal Muscle ». *Muscle & Nerve* 39 (2): 230-33. doi:10.1002/mus.21182.
- Morton, James P., Anna C. Kayani, Anne McArdle, et Barry Drust. 2009. « The Exercise-Induced Stress Response of Skeletal Muscle, with Specific Emphasis on Humans ». *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 39 (8): 643-62. doi:10.2165/00007256-200939080-00003.
- Morton, James P., Don P. M. Maclaren, Nigel T. Cable, Thomas Bongers, Richard D. Griffiths, Iain T. Campbell, Louise Evans, Anna Kayani, Anne McArdle, et Barry Drust. 2006. « Time Course and Differential Responses of the Major Heat Shock Protein Families in Human Skeletal Muscle Following Acute Nondamaging Treadmill Exercise ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 101 (1): 176-82. doi:10.1152/jappphysiol.00046.2006.
- Murphy, P. G., M. S. Ramer, L. Borthwick, J. Gaudie, P. M. Richardson, et M. A. Bisby. 1999. « Endogenous Interleukin-6 Contributes to Hypersensitivity to Cutaneous Stimuli and Changes in Neuropeptides Associated with Chronic Nerve Constriction in Mice ». *The European Journal of Neuroscience* 11 (7): 2243-53.
- Nagata, K. 1998. « Expression and Function of Heat Shock Protein 47: A Collagen-Specific Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 16 (7): 379-86.
- Nakai, A., M. Tanabe, Y. Kawazoe, J. Inazawa, R. I. Morimoto, et K. Nagata. 1997. « HSF4, a New Member of the Human Heat Shock Factor Family Which Lacks Properties of a Transcriptional Activator ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (1): 469-81.
- Nishimoto, Norihiro, Mitsuko Sasai, Yoshihito Shima, Masashi Nakagawa, Tomoshige Matsumoto, Toshikazu Shirai, Tadimitsu Kishimoto, et Kazuyuki Yoshizaki. 2000. « Improvement in Castleman's Disease by Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody Therapy ». *Blood* 95 (1): 56-61.
- Noble, Earl G., Kevin J. Milne, et C. W. James Melling. 2008. « Heat shock proteins and exercise: a primer ». *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Métabolisme* 33: 1050-65. doi:10.1139/H08-069.
- Oishi, Yasuharu, Mari Hayashida, Shinsuke Tsukiashi, Kohachi Taniguchi, Katsuya Kami, Roland R. Roy, et Yoshinobu Ohira. 2009. « Heat Stress Increases Myonuclear Number and Fiber Size via

- Satellite Cell Activation in Rat Regenerating Soleus Fibers ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 107 (5): 1612-21. doi:10.1152/jappphysiol.91651.2008.
- Ostrowski, K., T. Rohde, M. Zacho, S. Asp, et B. K. Pedersen. 1998. « Evidence That Interleukin-6 Is Produced in Human Skeletal Muscle during Prolonged Running ». *The Journal of Physiology* 508 (3): 949-53. doi:10.1111/j.1469-7793.1998.949bp.x.
- Ozcan, Umut, Erkan Yilmaz, Lale Ozcan, Masato Furuhashi, Eric Vaillancourt, Ross O. Smith, Cem Z. Görgün, et Gökhan S. Hotamisligil. 2006. « Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5790): 1137-40. doi:10.1126/science.1128294.
- Paulsen, Gøran, Kristian Vissing, John Magne Kalhovde, Ingrid Ugelstad, Monika Lucia Bayer, Fawzi Kadi, Peter Schjerling, Jostein Hallén, et Truls Raastad. 2007. « Maximal Eccentric Exercise Induces a Rapid Accumulation of Small Heat Shock Proteins on Myofibrils and a Delayed HSP70 Response in Humans ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (2): R844-853. doi:10.1152/ajpregu.00677.2006.
- Pedersen, Bente Klarlund, Adam Steensberg, et Peter Schjerling. 2001. « Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects ». *The Journal of Physiology* 536 (Pt 2): 329-37. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0329c.xd.
- Peraldi, P., et B. Spiegelman. 1998. « TNF-Alpha and Insulin Resistance: Summary and Future Prospects ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 182 (1-2): 169-75.
- Pimentel-Muñoz, Felipe X, et Brian Seed. 1999. « Regulated Commitment of TNF Receptor Signaling: A Molecular Switch for Death or Activation ». *Immunity* 11 (6): 783-93. doi:10.1016/S1074-7613(00)80152-1.
- Pirkkala, Lila, Päivi Nykänen, et Lea Sistonen. 2001. « Roles of the heat shock transcription factors on regulation of the heat shock response and beyond ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (7): 1118-31.
- Pösö, A. R., S. Eklund-Uusitalo, S. Hyypä, et E. Pirilä. 2002. « Induction of heat shock protein 72 mRNA in skeletal muscle by exercise and training ». *EQUINE EXERCISE PHYSIOLOGY - Equine veterinary Journal* 34 (6): 214-18.
- Pritts, T. A., Q. Wang, X. Sun, M. R. Moon, D. R. Fischer, J. E. Fischer, H. R. Wong, et P. O. Hasselgren. 2000. « Induction of the Stress Response in Vivo Decreases Nuclear Factor-Kappa B Activity in Jejunal Mucosa of Endotoxemic Mice ». *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 135 (7): 860-66.
- Puntschart, A., M. Vogt, H. R. Widmer, H. Hoppeler, et R. Billeter. 1996. « Hsp70 Expression in Human Skeletal Muscle after Exercise ». *Acta Physiologica Scandinavica* 157 (4): 411-17. doi:10.1046/j.1365-201X.1996.512270000.x.
- R Core Team. 2013. « R: A language and environment for statistical computing ». R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rey, A. I., J. Segura, E. Arandilla, et C. J. López-Bote. 2013. « Short- and Long-Term Effect of Oral Administration of Micellized Natural Vitamin E (D- α -Tocopherol) on Oxidative Status in Race Horses under Intense Training ». *Journal of Animal Science* 91 (3): 1277-84. doi:10.2527/jas.2012-5125.
- Ribeiro, S P, J Villar, G P Downey, J D Edelson, et A S Slutsky. 1996. « Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF-alpha posttranslational regulation. » *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154 (6): 1843-50. doi:10.1164/ajrccm.154.6.8970379.
- Richards, Peter J., Mari A. Nowell, Sankichi Horiuchi, Rachel M. McLoughlin, Ceri A. Fielding, Sandra Grau, Naoki Yamamoto, et al. 2006. « Functional Characterization of a Soluble gp130 Isoform and Its Therapeutic Capacity in an Experimental Model of Inflammatory Arthritis ». *Arthritis and Rheumatism* 54 (5): 1662-72. doi:10.1002/art.21818.
- Ritossa, F. s. d. « A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila* ». *Experientia* 18 (12): 571-73. doi:10.1007/BF02172188.

- Sampath-Wiley, Priya, Christopher D. Neefus, et Leland S. Jahnke. 2008. « Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützting (Rhodophyta, Bangiales) ». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361 (2): 83-91. doi:10.1016/j.jembe.2008.05.001.
- Scheller, Jürgen, Athena Chalaris, Dirk Schmidt-Arras, et Stefan Rose-John. 2011. « The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Including the Special Section: 11th European Symposium on Calcium, 1813 (5): 878-88. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Scheller, Jürgen, et Stefan Rose-John. 2006. « Interleukin-6 and Its Receptor: From Bench to Bedside ». *Medical Microbiology and Immunology* 195 (4): 173-83. doi:10.1007/s00430-006-0019-9.
- Shakhov, A. N., M. A. Collart, P. Vassalli, S. A. Nedospasov, et C. V. Jongeneel. 1990. « Kappa B-Type Enhancers Are Involved in Lipopolysaccharide-Mediated Transcriptional Activation of the Tumor Necrosis Factor Alpha Gene in Primary Macrophages ». *The Journal of Experimental Medicine* 171 (1): 35-47.
- Singh, Ishwar S., Ju-Ren He, Stuart Calderwood, et Jeffrey D. Hasday. 2002. « A High Affinity HSF-1 Binding Site in the 5'-untranslated Region of the Murine Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Is a Transcriptional Repressor ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4981-88. doi:10.1074/jbc.M108154200.
- Siu, Parco M., Randall W. Bryner, Julie K. Martyn, et Stephen E. Alway. 2004. « Apoptotic Adaptations from Exercise Training in Skeletal and Cardiac Muscles ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (10): 1150-52. doi:10.1096/fj.03-1291fje.
- Skurk, Thomas, Catherine Alberti-Huber, Christian Herder, et Hans Hauner. 2007. « Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (3): 1023-33. doi:10.1210/jc.2006-1055.
- Snyder, M. J., E. Girvetz, et E. P. Mulder. s. d. « Induction of Marine Mollusc Stress Proteins by Chemical or Physical Stress ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41 (1): 22-29. doi:10.1007/s002440010217.
- Srivastava, Pramod. 2002. « Roles of Heat-Shock Proteins in Innate and Adaptive Immunity ». *Nature Reviews Immunology* 2 (3): 185-94. doi:10.1038/nri749.
- Steensberg, A., M. A. Febbraio, T. Osada, P. Schjerling, G. van Hall, B. Saltin, et B. K. Pedersen. 2001. « Interleukin-6 Production in Contracting Human Skeletal Muscle Is Influenced by Pre-Exercise Muscle Glycogen Content ». *The Journal of Physiology* 537 (Pt 2): 633-39.
- Steensberg, A., A. D. Toft, P. Schjerling, J. Halkjaer-Kristensen, et B. K. Pedersen. 2001. « Plasma Interleukin-6 during Strenuous Exercise: Role of Epinephrine ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 281 (3): C1001-1004.
- Steensberg, Adam, Christian P. Fischer, Massimo Sacchetti, Charlotte Keller, Takuya Osada, Peter Schjerling, Gerrit van Hall, Mark A. Febbraio, et Bente Klarlund Pedersen. 2003. « Acute Interleukin-6 Administration Does Not Impair Muscle Glucose Uptake or Whole-Body Glucose Disposal in Healthy Humans ». *The Journal of Physiology* 548 (Pt 2): 631-38. doi:10.1113/jphysiol.2002.032938.
- Stouthard, J. M., R. P. Oude Elferink, et H. P. Sauerwein. 1996. « Interleukin-6 Enhances Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220 (2): 241-45. doi:10.1006/bbrc.1996.0389.
- Tamura, T, N Udagawa, N Takahashi, C Miyaura, S Tanaka, Y Yamada, Y Koishihara, Y Ohsugi, K Kumaki, et T Taga. 1993. « Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24): 11924-28.

- Tartaglia, L. A., D. Pennica, et D. V. Goeddel. 1993. « Ligand Passing: The 75-kDa Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor Recruits TNF for Signaling by the 55-kDa TNF Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (25): 18542-48.
- Touchberry, Chad D., Anisha A. Gupte, Gregory L. Bomhoff, Zachary A. Graham, Paige C. Geiger, et Philip M. Gallagher. 2012. « Acute Heat Stress prior to Downhill Running May Enhance Skeletal Muscle Remodeling ». *Cell Stress & Chaperones* 17 (6): 693-705. doi:10.1007/s12192-012-0343-5.
- Tupling, A. Russell. 2008. « Protection of Heart and Skeletal Muscle by Heat Shock Proteins ». *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Métabolisme* 33 (5): 1021-22. doi:10.1139/H08-066.
- Venojärvi, Mika, Niku Oksala, Susanna Kinnunen, et Mustafa Atalay. 2013. « Stress proteins and heat shock proteins: Role in muscle building and sport nutrition ». In *Nutrition and enhanced sports performance*, Elsevier, 229-35. ACADEMIC PRESS.
- Wirth, D., E. S. Christians, P. V. Drion, C. Dessy-Doize, et P. Gustin. 2003. « Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps). II. Hsp70: biomarqueur et acteur du stress cellulaire ». *Annales de médecine vétérinaire* 147 (2): 127-44.
- Wirth, D., P. Gustin, P. V. Drion, C. Dessy-Doize, et E. S. Christians. 2002. « Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I: Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques ». *Annales de médecine vétérinaire* 146 (4): 201-16.
- Wray, D. Walter, Steven K. Nishiyama, Aurélien Monnet, Claire Wary, Sandrine S. Duteil, Pierre G. Carlier, et Russell S. Richardson. 2009. « Antioxidants and Aging: NMR-Based Evidence of Improved Skeletal Muscle Perfusion and Energetics ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 297 (5): H1870-75. doi:10.1152/ajpheart.00709.2009.

Impact d'un extrait standardisé d'une algue rouge *Porphyra umbilicalis* PORPHYRAL HSP ND sur Hsp72, IL-6 et TNF- α

RESUME

Le PORPHYRAL HSP ND est un ingrédient dont les capacités de stimulation des HSP ont été prouvées *in vitro*. L'objectif de cette étude est de montrer qu'il améliore la résistance aux stress, en particulier lors d'efforts physiques. Est-il possible de trouver des marqueurs de cet effet *in vivo* ? Ou serait-ce un effet dopant ? L'expérience menée sur 6 chevaux de l'Ecole Nationale d'Equitation lors d'un cross de forte intensité n'a pas permis de conclure sur un effet du PORPHYRAL HSP ND sur les valeurs systémiques de Hsp72, IL-6 et TNF- α . Les échantillons sanguins et urinaires prélevés après 7 jours de complémentation ont permis de montrer que le complément alimentaire composé de PORPHYRAL HSP ND et de Vitamine E est non dopant.

En conclusion, en raison de nombreux biais dans le protocole, il est difficile de savoir si les marqueurs choisis étaient les bons ou si le PORPHYRAL HSP ND n'a pas l'action escomptée. Plusieurs études de cas montrent néanmoins une bonne efficacité clinique chez les sportifs de haut niveau.

MOTS CLES

CHEVAL – INTERLEUKINE 6 – TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA – DOPAGE – COMPLEMENT ALIMENTAIRE – STRESS – STRESS OXYDATIF – ELISA – EFFORT PHYSIQUE

JURY

Président : Yves Maugars
Rapporteur : Anne Couroucé Malblanc
Assesseur : Julie Hervé
Invité : Claude Faivre

ADRESSE DE L'AUTEUR

17, rue des Grands Patis
44300 NANTES

Nom de l'imprimeur : Corep Nantes – Jonelière