



EVALUATION D'UN COMPLEMENT ADAPTOGENE SUR LA PERFORMANCE ET SUR L'IMMUNITE NON SPECIFIQUE CHEZ LES PUR-SANG

CETTE ETUDE A ETE FINANCEE PAR PAVESCO - TWYDIL®

TATIANA ART,
 CLEMENCE MIGNOT,
 CELINE MOLITOR,
 BRIEUC DE MOFFARTS,
 AUDREY FRAIPONT,
 PIERRE LEKEUX
 DEPARTEMENT
 DES SCIENCES
 FONCTIONNELLES,
 CENTRE DE MEDECINE
 DU SPORT, FMV, ULG,
 BELGIQUE.

La réalisation d'un effort représente pour l'organisme le stress le plus important que des conditions normales et naturelles puissent provoquer. Chez le cheval de course, l'effort s'accompagne d'une augmentation de la fréquence cardiaque (jusqu'à 240c/min), de la fréquence respiratoire (jusqu'à 120 r/min), de la température corporelle (jusqu'à 41°C dans les muscles), du taux de globules rouges et des leucocytes circulants (multiplié parfois par 2), de l'acide lactique dans les muscles et le sang (le pH peut être inférieur à 7,000), des sécrétions hormonales, etc... En outre, des travaux récents ont montré que chez le cheval comme chez l'homme, ce stress lié à l'effort diminuait la qualité de la réponse immunitaire -donc des défenses contre les infections- dans les jours qui suivent la course («open window period»), favorisant dès lors le développement de maladies, notamment respiratoires, durant cette période délicate. L'entraînement, qui consiste en la répétition régulière de l'effort, vise à diminuer l'intensité du stress associé au travail physique en adaptant et en améliorant les réponses physiologiques à cette sollicitation extrême. Outre l'entraînement, l'alimentation et les compléments peuvent avoir des

effets protecteurs contre le stress, effets dits «adaptogènes». Dans cette étude, un complément contenant entre autres de la Vit C, des prébiotiques et des ginsengs a été testé pour ses effets possibles sur la performance sportive, sur le stress physique lié à l'effort et sur la résistance aux infections respiratoires.

PRESENTATION DE L'ETUDE

L'étude reposait sur le suivi de chevaux réalisé d'une part au repos, et d'autre part au cours d'une épreuve d'effort à fatigue (Test) réalisée sur un tapis roulant, et cela avant et après 12 jours de complémentation orale. Huit pur-sang irlandais non entraînés (3 à 4 ans), en bonne santé à l'examen clinique ont été utilisés. Durant une période d'adaptation de 1 mois ces chevaux ont été débouffés et progressivement habitués au travail sur le tapis roulant. Ils ont été hébergés dans la même écurie et nourris de la même façon (2 litres de concentrés par jour et fourrage ad libitum) tout au long du protocole expérimental. Au cours de cette période, la VLA4 (vitesse de course à laquelle le seuil sanguin de 4 mmol/l de lactate est atteint) de chaque cheval a été évaluée lors d'un travail au tapis roulant.



LES MESURES REALISEES

Les mesures réalisées avaient différentes finalités, à savoir (1) de mesurer la performance, (2) d'évaluer le stress, et (3) de contrôler l'immunité. Elles ont été systématiquement réalisées sur les chevaux ayant reçu un placebo et le complément actif. L'ensemble des personnes impliquées dans les manipulations des chevaux et le relevé des paramètres ignoraient le traitement reçu.

Mesures au repos: Étude transcriptomique de 23 000 gènes leucocytaires par la technique des micro-damiers (voir encadré page 9).

Mesures pendant l'effort: les paramètres de médecine du sport directs (lactates, fréquence cardiaque, enzymes musculaires) et indirects (VLA4, V200) (pour plus d'info voir HPH 08-09 page 45-48), basés sur les mesures de fréquence cardiaque et de lactatémie ont été mesurés. Ces paramètres donnent une mesure objective de l'intensité de l'effort et du stress qu'il a induit sur un organisme donné.

Mesures avant et après effort

- Hormonales: les variations plasmatiques d'hormones du stress telles les bêta-endorphines et le cortisol donnent également une idée de l'intensité du stress lié à l'effort. Il est par ailleurs intéressant de signaler que l'élévation du cortisol est l'un des facteurs qui induit une diminution de la réponse immunitaire.
- Variations de la réponse immunitaire des leucocytes pulmonaires (voir encadré page 12). Cette variation a été étudiée en évaluant la réponse des globules blancs, prélevés dans le liquide pulmonaire et placés dans un mi-

lieu de culture, à des simulations d'attaques virales ou bactériennes par adjonction de substances dont la nature se rapproche de celle de virus ou de bactéries.

LE TIMING DES MESURES ET PRELEVEMENTS

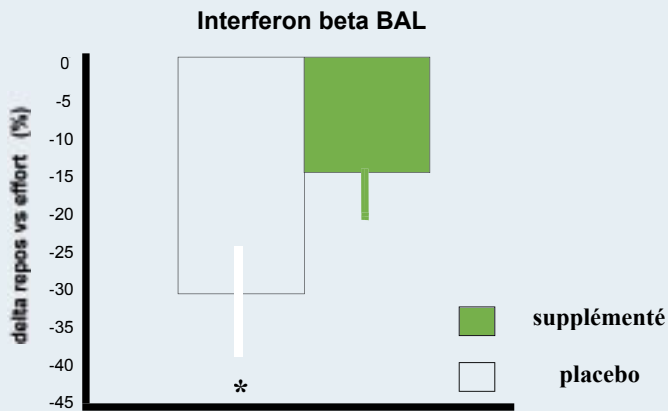
Deux jours avant et un jour après les tests d'effort, les chevaux ont été tranquilisés pour la réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA), duquel ont été extraites les cellules blanches pour tester ex-vivo leur réponse immunitaire à des stimulations spécifiques. Ces tests ont été répétés avant et après chaque test d'effort, soit aux jours J1 -et J27- (évaluation de l'effet de l'effort), J10 -et J36- (évaluation de l'effet du complément) et J13 -et J39- (évaluation de l'effet du complément sur l'effet de l'effort).

Au jour J0, du sang a été prélevé dans le but d'en isoler les cellules blanches pour l'étude transcriptomique. Ensuite, les chevaux -équipés d'un matériel permettant de mesurer l'ECG en continu- ont réalisé un test au tapis roulant (test 1) qui consistait en un échauffement, un long palier de galop (3500m) à la vitesse de VLA4 (déterminée précédemment). Après 2 minutes de récupération, le cheval était remis au galop à VLA4 pour 1 minute, puis suivaient 3 paliers incrémentés de 1 m/sec d'une durée de 1 minute pour les deux premiers paliers et prolongé jusqu'à fatigue pour le dernier, c'est-à-dire jusqu'à ce que le cheval ne puisse plus tenir la vitesse malgré les encouragements vigoureux d'un opérateur. Le «time to fatigue» (TTF) (soit le temps, en secondes, qu'a duré le dernier palier) a été noté pour chaque cheval.

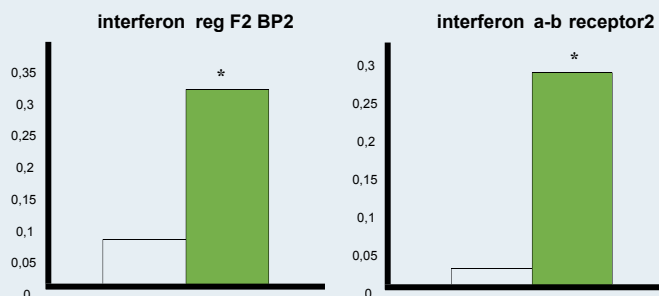


TATIANA ART (DVM, PhD, Dipl ECEIM)

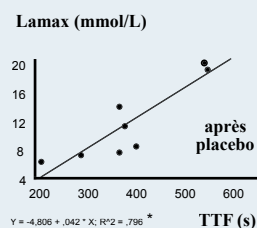
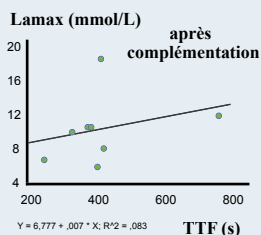
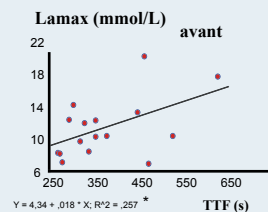
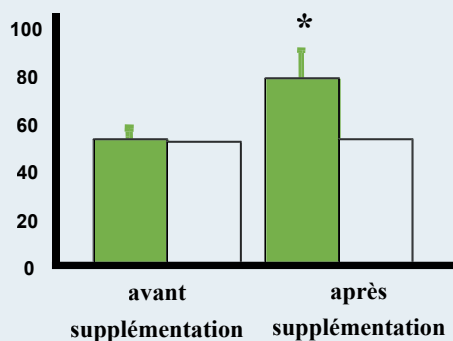
Professeur de Physiologie de l'exercice musculaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg, 2009. Responsable du Centre de Médecine du Sport de la Faculté de Médecine Vétérinaire.



Expression génique de marqueur lymphocytaire sanguin (Log2)



TTF/lactate (s.(mmol/L)⁻¹)



Les chevaux ont été ensuite répartis au hasard en 2 groupes de 4 chevaux: un groupe traité et un groupe témoin. Dès le jour J1, le groupe traité a reçu le complément vitaminé (1 dose par jour) administré dans la ration durant une période de 12 jours tandis que le groupe témoin a reçu un placebo. A J12, le test d'effort a été répété à l'identique du jour J0 (test 2) sur les 2 groupes.

Une période de 15 jours de wash-out a été ensuite respectée durant laquelle les chevaux ont été placés dans un paddock à l'extérieur.

Au jour J26, le test d'effort a été répété (test 3). Ensuite, la supplémentation (complément ou placebo) a été mise en œuvre en inversant les groupes. Après 12 jours, soit au jour J38, le test d'effort a été réalisé une dernière fois (test 4).

MATERIEL ET DESCRIPTION DES ANALYSES

Paramètres physiologiques pendant l'effort

La fréquence cardiaque a été enregistrée en continu grâce à un système Holter et la lactatémie du sang veineux grâce à un analyseur portable. Des prises de sang ont été réalisées avant et 1 heure après l'effort pour doser le taux de globules rouges, les CK (enzymes musculaires) et les hormones du stress (bêta-endorphines et cortisol).

Lavages broncho-alvéolaires, cytologie et extraction des cellules blanches

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés à l'aide d'un fibroscope et sous tranquillisation légère. Trois cent soixante millilitres de sérum physiologique étaient instillés dans le poumon et récoltés. Le liquide ainsi obtenu était utilisé pour comptage des cellules et isolation de celles-ci par plusieurs centrifugations successives. Après isolation, les cellules étaient stimulées par des substances simulant la présence de bactéries ou de virus. Leur réponse était évaluée par «lecture» de leur ARNm (voir les graphiques).

Etude transcriptomique sur les cellules blanches sanguines

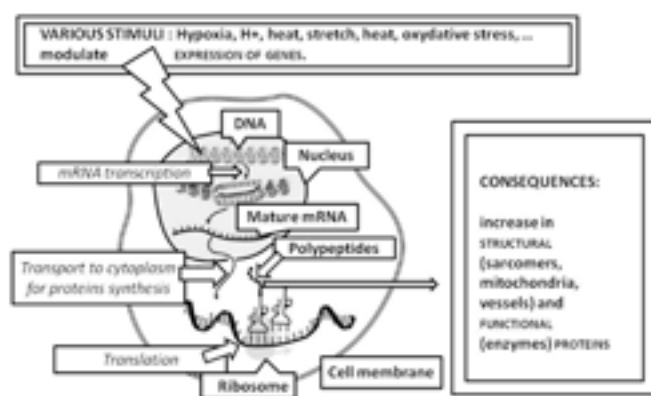
Chez 4 chevaux, aux jours J0 - &J26- et aux jours J12 -&J38-, juste avant l'effort, 10 ml de sang ont été récoltés pour en extraire l'ARN.

RESULTATS

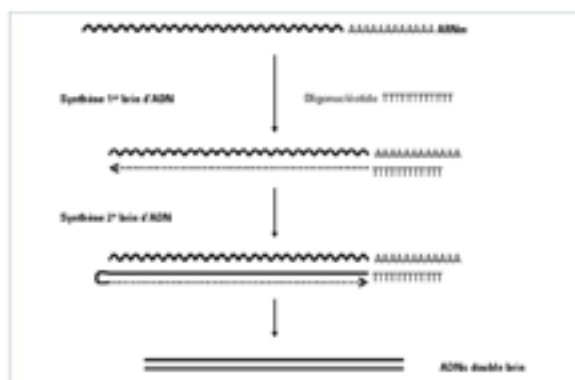
Effet du complément sur l'aptitude à l'effort. L'ensemble des résultats obtenus au cours de l'étude d'effort confirme que la réalisation d'un effort important (ici jusqu'à fatigue) induit un stress physiologique important, comme en témoignent entre autres les fréquences cardiaques, la lactatémie, l'élévation des hormones du stress, etc ...

→ QU'EST-CE QUE LA TRANSCRIPTOMIQUE?

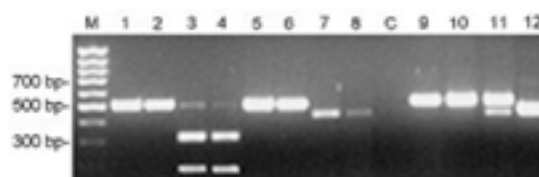
L'étude de la transcriptomique consiste à examiner, par des techniques de biologie moléculaire élaborées, si certaines parties du génome sont exprimées et traduites. Pour simplifier à l'extrême, le génome présent dans la cellule est une sorte de mode d'emploi permettant de construire et de faire fonctionner chaque organisme. Les ordres pour ces constructions et fonctionnements sont émis par le biais de l'ARNm, que l'on pourrait comparer à du courrier que le génome envoie dans la cellule pour induire la synthèse de protéines destinées à élaborer de nouveaux tissus, de nouvelles enzymes, des cytokines ou des hormones par exemple.



Lors d'une étude transcriptomique, on «intercepte» ce courrier (extraction de l'ARNm des cellules) et on le lit (transcription et PCR, ou lecture grâce à des micro-damiers), ce qui permet de détecter de façon précoce et fine des changements physiologiques induits par des variations de conditions (telles celles liées à l'effort, à l'entraînement, à l'alimentation, mais aussi à l'inflammation ou à l'infection), et ceci parfois bien avant que les manifestations fonctionnelles ou cliniques de ces adaptations ne soient visibles.



C'est pourquoi, il a été choisi de contrôler l'effet du complément par ce biais. Les variations d'expression génique ont été étudiées dans les leucocytes circulants, grâce à une analyse transcriptomique réalisée sur micro-damiers homologues équins. (voir HPH 04-05, 46-49).



Le complément adaptogène tend à diminuer la production maximale de lactate alors qu'il maintient un TTF très élevé. Sur un plan statistique, le rapport TTF/lactate change significativement: la relation qui existait au départ entre la production de lactate et le TTF (plus le TTF est long, plus la quantité de lactates produits est importante) se maintient chez les chevaux ayant reçu le placebo mais disparaît chez les chevaux complémentés. Sur le plan hormonal, le cortisol plasmatique est augmenté suite à l'effort tandis que les bêta-endorphines restent stables. L'augmentation du TTF lors du second test s'accompagne d'une augmentation de sécrétions des bêta-endorphines qui tendent dès lors à être corrélées avec ce paramètre dans le groupe traité ($p < 0.06$).

Effet du complément sur la diminution de réponse immunitaire innée en période post-effort

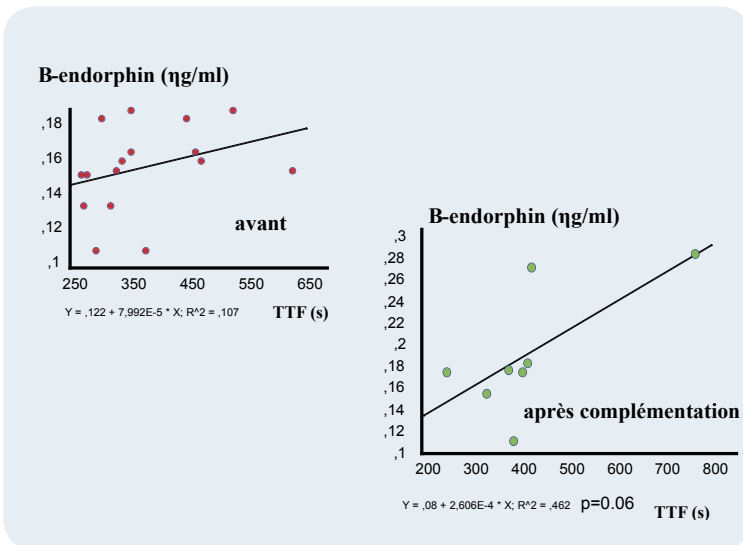
L'effort induit une diminution de la réponse des cellules blanches pulmonaires face à une simulation d'attaque virale. Cela signifie que lorsque les cellules blanches sont stimulées par du polyIC (qui a la même forme qu'un double brin d'ARN viral), leur réponse, mesurée par l'expression génique de certaines cytokines pro-inflammatoires, est moins vigoureuse 24 heures après l'effort. L'administration du complément adaptogène pendant 12 jours tend à modérer cette atténuation de réponse, comme le montre par exemple la sur-expression génique de l'interféron bêta, qui est maintenue 24 heures après effort chez les chevaux complémentés.

Effet du complément sur l'expression génique des globules blancs sanguins

Les résultats montrent que sur les nombreux gènes testés, les chevaux complémentés, comparés aux chevaux ayant reçu le placebo, ont présenté une sur-expression de certains gènes liés à l'immunité (renforcée) et de certains gènes liés à la résistance au stress métabolique.

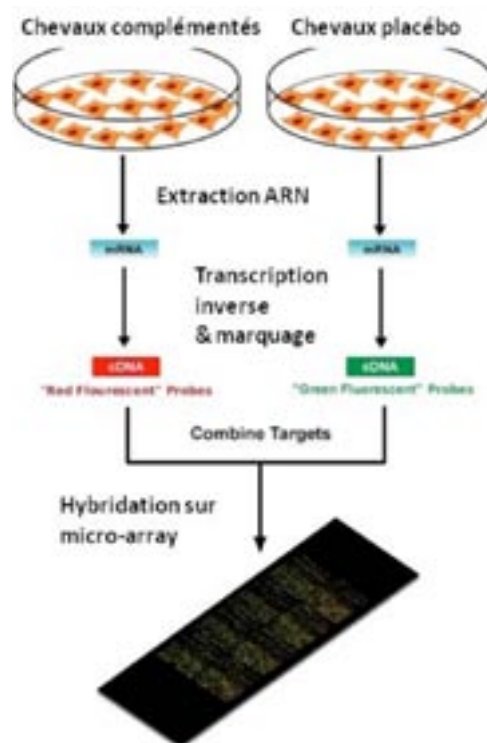
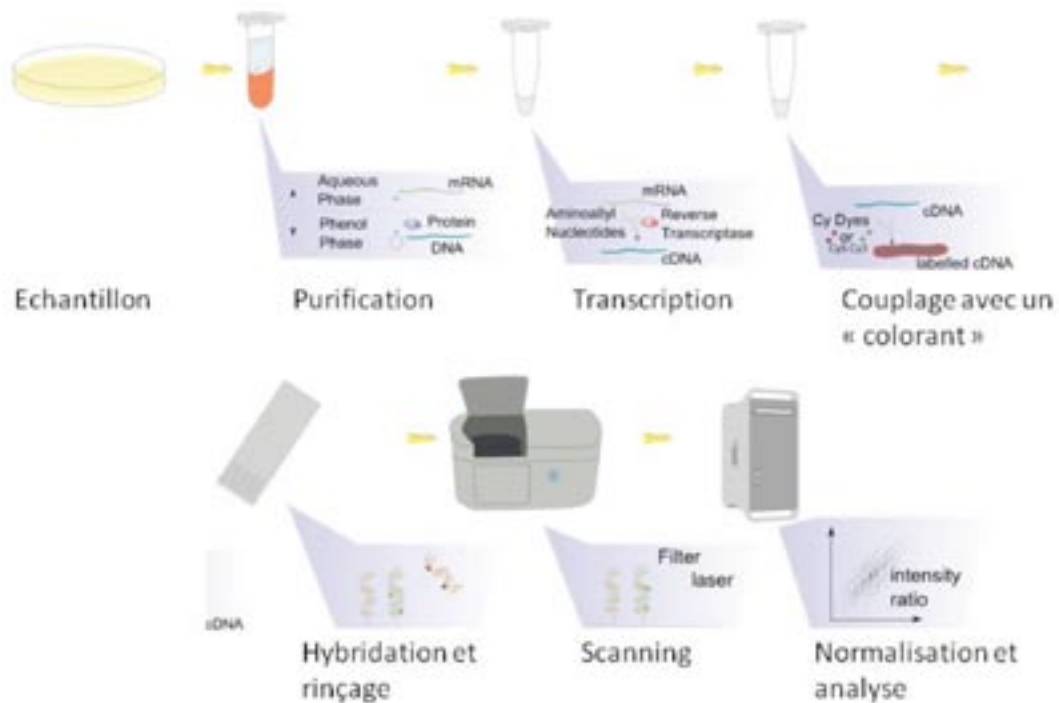
CONCLUSIONS

Le complément adaptogène utilisé dans cette étude semble avoir des effets protecteurs contre la chute d'immunité qui apparaît après un effort, et ce tant au niveau sanguin qu'au niveau pulmonaire. De même, il semble diminuer l'ampleur de la production de lactates lors de l'effort intense, ayant par là les effets similaires à ceux de l'entraînement, à savoir favoriser le développement et l'utilisation des filières métaboliques aérobie.

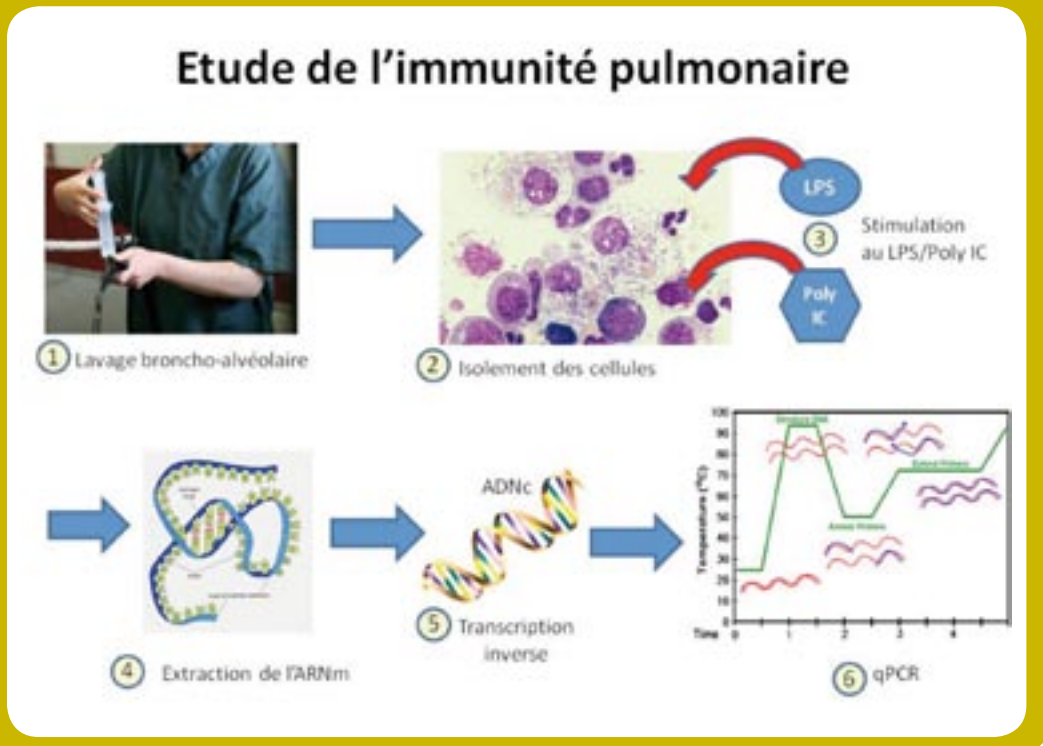


→ LA TECHNIQUE DES MICRO-DAMIERS

Comme décrit dans l'encadré précédent, il s'agit de quantifier l'expression de certains gènes. Lors de RT-PCR, on détecte la présence d'ARNm en ciblant les gènes que l'on suppose être sur-exprimés ou sous-exprimés. Dans la technique des microdamiers, on analyse la réponse génique de l'ensemble du génome. L'inconvénient est que la réponse de 23.000 gènes doit être examinée et que l'analyse de ce screening complet est beaucoup plus lourde et ne peut se faire que grâce à des analyses statistiques sophistiquées. L'avantage est qu'aucune modification d'expression n'échappe à l'analyse.



→ LES DIFFERENTES ETAPES DE L'ETUDE DE L'IMMUNITE INNEE AU NIVEAU DES CELLULES BLANCHES DU SYSTEME RESPIRATOIRE PROFOND.



QUESTIONS AU PROFESSEUR PIERRE LEKEUX

Professeur de Physiologie de la Faculté Vétérinaire de Liège

1/ Comment expliqueriez-vous à un professionnel du cheval non scientifique ce que la présente étude apporte comme informations nouvelles ?

Le complément adaptogène testé dans cette étude semble avoir un double effet bénéfique chez le cheval athlète. Premièrement, ce complément semble améliorer la capacité qu'a, un cheval stressé par la compétition, de se défendre vis-à-vis des nombreux agents pathogènes présents dans son système respiratoire. Deuxièmement, ce complément semble améliorer l'efficacité de la production d'énergie au niveau des muscles, et donc la qualité de la performance.

2/ Pourquoi l'immunité est-elle si importante chez le cheval de course et pourquoi lors de ces études s'être focalisé sur le poumon en particulier ?

Le cheval de course est doublement confronté aux maladies infectieuses (virales et bactériennes) qui s'attaquent prioritairement à la principale voie d'entrée dans l'organisme, à savoir le système respiratoire. D'une part, le cheval de course voyage beaucoup et rencontre de nombreux autres chevaux, ce qui favorise la dissémination et donc la contagion des maladies infectieuses. D'autre part, le stress de l'entraînement et de la compétition a un effet négatif sur son système immunitaire, à savoir sa capacité à se défendre lorsqu'il est agressé par un virus ou une bactérie. C'est ce qui explique que, malgré les vaccinations, les infections respiratoires sub-cliniques sont si fréquentes chez le cheval de course, avec leurs effets délétères sur la performance.

3/ De façon pratique, pourquoi peut-on dire que la complémentation mime en

quelque sorte l'effet de l'entraînement ?

Le complément adaptogène ne remplace pas l'entraînement mais semble en favoriser les effets bénéfiques, à savoir une meilleure utilisation de l'oxygène et donc une moindre production de lactate pour un effort donné. La performance et la récupération post-effort devraient en théorie en être améliorées.

4/ En pratique, dans quelles disciplines et à quel moment recommanderiez-vous d'utiliser le complément alimentaire testé ?

Ce genre de complément adaptogène devrait être indiqué chez des chevaux qui effectuent des efforts intenses et répétés, quelle que soit la discipline. Le moment le plus approprié devrait être la phase d'entraînement intensif et la période de compétition.