

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation:** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Effets de l'oxygénation et de l'exercice sur la fluidité membranaire de l'érythrocyte du cheval
- Titre de la thèse en anglais :** Effects of oxygenation and exercise on equine erythrocyte membrane fluidity
- Candidat :** Karine PORTIER
- Promoteur :** Professeur Pierre LEKEUX
- Co-promoteur :** Professeur Jean COUDERT
- Département et Service :** Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
- Date de la défense publique :** 4 septembre 2007
- Composition du Jury:** N. Antoine, F. Coignoul, N. Fellmann, F. Gasthuys, P. Gustin, N. Kirschvink, M. Lamy, A. Seret, D. Serteyn.

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'intégrité de la structure et de la dynamique de la membrane plasmatique est essentielle à la fonction de la cellule (Shiga et Maeda, 1980 ; Chien, 1981, Buchwald *et al.*, 2000). Cette intégrité peut être évaluée par la mesure de la fluidité membranaire, reflet des mouvements des éléments membranaires au sein de la bicouche phospholipidique (Hollan, 1996; Keddad *et al.*, 1996). Or l'intégrité de la membrane est menacée, entre autre, par les modifications de la structure lipidique résultant de lipoperoxydations (Shinitzky, 1984). Ces peroxydations lipidiques résultent des attaques radicalaires par des espèces oxygénées activées (EOA) produites lors de stress oxydant sur les acides

gras membranaires (Pincemail *et al.*, 1996). Le globule rouge est un modèle d'étude cellulaire intéressant car sa structure est simple et car sa fonction de transport de l'oxygène et de véhicule de l'hémoglobine l'expose particulièrement aux attaques radicalaires (Baskurt *et al.*, 1997).

Certaines conditions physiologiques ou thérapeutiques peuvent provoquer une augmentation de la production des radicaux libres, qui, si elle n'est pas contrebalancée par un statut antioxydant adéquat, aboutit à un stress oxydant. Par exemple l'inspiration d'oxygène pur et l'hyperoxémie qui en résulte peut être toxique à plus ou moins long terme et favoriser le stress oxydant (Mensack *et al.*, 1999, Vento *et al.*, 2002). Mais à l'opposé, l'hypoxémie peut également induire

un stress oxydant (Fluck, 2005). Le cheval est un modèle d'étude de cette condition intéressante car, anesthésié, il présente un gradient alvéolo-artériel en oxygène plus élevé que chez l'homme, qui peut conduire à une hypoxémie, d'autant plus que la fraction inspirée en oxygène est basse (Nyman et Hedenstierna, 1990). Le cheval peut présenter également un stress oxydant lors d'un exercice important (de Moffarts *et al.*, 2004), alors que la demande énergétique est très élevée et sa consommation maximale en oxygène peut atteindre 3 fois celle de l'homme (130-140 ml/kg/min versus 40-45 ml/kg/min STPD) (Art et Lekeux, 1993). Ce stress oxydant peut être modulé par un apport alimentaire en antioxydant adéquat (de Moffarts *et al.*, 2005). Enfin, l'étude de la fluidité

dité membranaire du globule rouge donne des informations sur ses capacités fonctionnelles et pourrait être un marqueur direct du stress oxydant.

Nous posons l'hypothèse que les conditions d'oxygénations extrêmes qui peuvent être rencontrées lors d'une anesthésie ou le stress oxydant à l'exercice chez le cheval peuvent affecter la fluidité membranaire des érythrocytes et que ces variations peuvent être modulées par la modification de la structure membranaire du globule rouge par un supplément antioxydant oral adéquat.

L'objectif de ce travail est d'évaluer les effets de différentes conditions d'oxygénation et d'oxydation *in vitro* (par contact avec différents mélanges gazeux), puis *in vivo* sous anesthésie générale (en faisant varier la fraction inspirée en oxygène) et à l'exercice, et enfin d'évaluer les effets d'une supplémentation enrichie en acides gras de type oméga 3 sur la fluidité membranaire du globule rouge de chevaux.

RÉSULTATS

Les faibles pressions partielles en oxygène dans le sang, obtenues *in vitro* et *in vivo* sous anesthésie (< 45 mmHg et < 60 mmHg respectivement) n'ont pas eu d'effet sur la fluidité ni sur la structure de la membrane érythrocytaire. On peut supposer soit que le stimulus a été insuffisant, soit que la protection de la membrane résulte d'une augmentation de la capacité antioxydante du plasma et des défenses cellulaires. Les pressions partielles en oxygène dans le sang obtenue *in vitro* (> 500 mmHg) ont induit un stress oxydant modéré qui n'a pas affecté la structure phospholipidique de la membrane malgré la peroxydation des acides gras de type oméga 6. L'ensemble a affecté de façon non

significative la fluidité membranaire qui a peut-être été protégée par une augmentation de la capacité antioxydante du plasma. In vivo, les pressions partielles en oxygène observées dans le sang (> 200 mmHg) ont été insuffisantes pour induire des peroxydations significatives et des modifications de la fluidité membranaires. En revanche les valeurs élevées de PaO₂ ont augmenté la sensibilité du sang à l'hémolyse dans un premier temps puis sa résistance 24 heures après un retour à la normoxie.

Par ailleurs, l'exercice intense semble diminuer la fluidité membranaire du globule rouge chez le cheval de sport. Cette diminution s'observe dès 15 minutes après l'arrêt de l'exercice et persiste 24 heures après. Cependant l'exercice n'a pas eu d'influence directe sur la composition membranaire en acides gras. En revanche, les modifications des concentrations des marqueurs indirects du stress oxydant constatées dans cette étude permettent de mettre en évidence l'existence d'un déséquilibre entre pro et antioxydant consécutif à l'exercice. Les capacités antioxydantes (hydrosolubles et liposolubles) ont également été mobilisées. Or, il existe également des corrélations entre certains de ces marqueurs indirects et la fluidité membranaire. Par exemple, conformément à ce que l'on pouvait attendre, l'exercice induit une augmentation significative de la concentration en protéines oxydées. Or l'augmentation de leur concentration est d'ailleurs corrélée à une diminution de la fluidité membranaire. Cette observation est en accord avec les effets de l'exercice sur la fluidité. De plus la fluidité membranaire, avant et après exercice, diminue lorsque la concentration en créatinine kinase augmente. En effet ces deux mar-

queurs sont des indicateurs de souffrance cellulaire. L'ensemble de ces constatations conduit à penser que le temps de corrélation-relaxation (T_c), marqueur de la fluidité membranaire, pourrait être un marqueur de stress lié à l'exercice chez le cheval. Ceci est en accord avec les données de la littérature chez l'athlète humain (Cazzola *et al.*, 2003).

La supplémentation n'a pas eu d'effet significatif direct sur l'évolution de la fluidité membranaire observée au repos. La supplémentation a pourtant influencé la structure de la membrane. En effet la complémentation a induit une augmentation du pourcentage d'acides gras de type oméga 3 contenus dans la membrane érythrocytaire ainsi que du ratio oméga3/oméga6 pendant la période de repos. Cela résulte de l'incorporation sélective dans la membrane de l'EPA et du DHA apportés par voie orale. Mais aucune corrélation n'a été observée dans notre étude entre la composition en acides gras de la membrane et le marqueur de la fluidité membranaire. La supplémentation n'a pas eu d'effet significatif direct sur l'évolution de la fluidité membranaire observée à l'exercice. Cependant il est intéressant de noter que la diminution de la fluidité observée dans le groupe placebo 15 minutes après exercice n'est pas significative dans le groupe supplémenté. On pourrait alors supposer que le supplément a limité la diminution immédiate de la fluidité membranaire. La supplémentation a influencé les marqueurs indirects du stress oxydant. Le supplément a limité significativement la diminution de, voire induit l'augmentation de la concentration en SOD après exercice. La fluidité, dans le groupe supplémenté, après exercice, a été

d'ailleurs corrélée aux valeurs de la concentration en SOD avant et après exercice. Ceci suggère encore que la fluidité membranaire peut être affectée par un processus oxydant.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de tester l'hypothèse selon laquelle la fluidité membranaire des globules rouges est influencée par certaines conditions d'oxygénations, par le stress oxydant observé à l'exercice et les modifications de la structure lipidique de la membrane par un supplément oral enrichi en acides gras de type oméga 3. Il résulte des études menées chez le cheval que :

- 1-les conditions d'oxygénation les plus extrêmes qui peuvent être rencontrées en conditions atmosphériques ne semblent pas affecter la fluidité de la membrane.
- 2-un exercice intense, associé à une demande énergétique accrue peut induire une diminution de la fluidité membranaire en corrélation avec les marqueurs du stress oxydant.
- 3-des modifications de la structure membranaire en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3 n'affectent pas la fluidité membranaire mais modulent les effets du stress oxydant lors de l'exercice.

4-la fluidité membranaire des érythrocytes pourrait être considérée comme un marqueur direct du stress oxydant dans certaines conditions mais semble moins sensible et global que d'autres marqueurs du stress cellulaire tels que le test d'hémolyse ou la mesure de la concentration de peroxydes lipidiques spécifiques.

L'ensemble de ces conclusions conduit à penser que seule une augmentation de l'activité mitochondriale, lors d'une demande énergétique accrue, peut produire un stress oxydant suffisant capable de modifier la fluidité membranaire.

La cellule semble protégée par un système de défense particulièrement efficace tant au niveau plasmatique que cytoplasmique ou membranaire.

En conséquence des conclusions apportées précédemment il semblerait que l'oxygène seul, ne soit pas un élément suffisant pour induire des modifications de la dynamique membranaire. Seule une production radicalaire accrue responsable d'un stress oxydant d'intensité suffisante peut être à l'origine de modification de la fluidité de la membrane. La mesure des effets de l'intensité de l'exercice sur la fluidité membranaire pourrait répondre à cette hypothèse.

Par ailleurs, l'intérêt de l'étude de la

fluidité membranaire repose sur les conséquences de sa modification : à savoir dans le pire des cas la lyse cellulaire, et, dans le meilleurs des cas, les troubles de la fonction cellulaire. En ce qui concerne le globule rouge, le maintien de la dynamique membranaire est corrélé à sa capacité de déformation et à sa capacité de transport de l'oxygène. Une fois les conditions de modifications de la fluidité membranaire bien établies pendant l'effort, il serait intéressant d'observer leurs conséquences au niveau cellulaire (déformabilité) et tissulaire (oxygénation).

Enfin, l'étude des variations de la fluidité membranaire et de leur prévention pourrait être intéressante dans certaines pathologies associées à un stress oxydant. En effet, le cheval est particulièrement sensible aux myosites post-anesthésiques. Le mécanisme impliqué est l'ischémie-reperfusion responsable d'une production massive de radicaux libres à l'origine de lyse cellulaire et de l'inflammation musculaire (Serteyn *et al.*, 1990). L'étude de la protection des membranes dans le cadre de cette pathologie pourrait ouvrir des perspectives quand à l'élaboration d'un traitement préventif.

REFERENCES

- BASKURT O.K., FARLEY R.A., MEISELMAN H.J. Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat: a comparative study. *Am. J. Physiol.*, 1997, **273**, H2604-H2612.
- ART T, LEKEUX P. Training induced modifications in cardiorespiratory and ventilatory measurements in thoroughbred horses. *Equine Vet. J.*, 1993, **25**, 532-6
- BUCHWALD H., O'DEA T.J., MENCHACA H.J., MICHALEK V.N., ROHDE T.D. Effect of plasma cholesterol on red blood cell oxygen transport. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000, **27**, 951-955.
- CAZZOLA R., RUSSO-VOLPE S., CERVATO G., CESTARO B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and

- sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2003, **33**, 924-930.
- CHIEN S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann. Rev. Physiol.*, 1987, 49, 177-192.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., MICHAUX C., CAYEUX K., DEFRAIGNE J.O., LEKEUX P. Impact of training and exercise intensity on blood antioxidant markers in healthy Standardbred horses. *ECEP*, 2004, **1**, 211-220.
- DE MOFFARTS B., KIRSCHVINK N., ART T., PINCEMAIL J., LEKEUX P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, 2005, **169**, 65-74.
- FLUCK M. Hypoxaemia enhanced peripheral muscle oxidative damage in COPD. *Thorax*, 2005, **60**, 797-798.
- HOLLAN S. Membrane fluidity of blood cells. *Haematologia (Budap.)*, 1996, 27, 109-127.
- MENSACK S., MURTAUGH R. Oxygen toxicity. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 1999, 21, 341-351.
- NYMAN G., HEDENSTIERNA G. Ventilation-perfusion relationships in the anaesthetised horse. *Equine Vet. J.*, 1990, 21, 274-281.
- PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., LIMET R. Oxidative stress in clinical situations: fact or fiction ? *Eur. J. Anaesthesiol.*, 1996, 13, 219-234.
- SERTEYND, MOTTARTE, DEBYC, DEBY-DUPONT G, PINCEMAIL J, PHILIPART C, LAMY M. Equine postanaesthetic myositis: a possible role for free radical generation and membrane lipoperoxidation. *Res. Vet. Sci.*, 1990, 48, 42-46.
- SHIGA T., MAEDA N. Influence of membrane fluidity on erythrocyte functions. *Biorheology*, 1980, 17, 485-499.
- SHINITZKY M. Physiology of membrane fluidity. In: Physiology of membrane fluidity. Vol I CRC Press : Boca Raton, 1984, 1-39.
- VENTO M., ASENSI M., SASTRE J., LLORET A., GARCIA-SALA F., MINANA J.B., VINA J. Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin. Perinatol.*, 2002, 26, 406-410.
- PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE**
- PORTIER K., DE MOFFARTS B., FELLMANN N., KIRSCHVINK N., MOTTA C., LETELLIER C., RUELLAND A., VAN ERCK E., LEKEUX P., COUDERT J. The effects of dietary n-3 enriched supplementation on erythrocyte membrane fatty acid composition and fluidity in exercising horses. *Equine Vet. J.*, 2006, Suppl. **36**, 279-284.
- PORTIER K., GUICHARDANT M., DEBOUZY JC., CROUZIER D., GERAUD I., KIRSCHVINK N., LEKEUX P., FELLMANN N., COUDERT J. In vitro effects of oxygen on physico-chemical properties of horse erythrocyte membrane. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2007, **23**, 340-346.
- PORTIER K., CROUZIER D., GUICHARDANT M., PROST M., DEBOUZY J.-C., RICHARD Y., KIRSCHVINK N., FELLMANN N., LEKEUX P., COUDERT J. Breathing air or pure oxygen during anesthesia: effects on horse erythrocyte membrane physico-chemical properties, blood viscosity, muscle oxygenation and perfusion. Soumis.

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES DU PROJET

- Laboratoire de biophysique, groupe RMN, CRSSA, Grenoble (Pr Debouzy);
- UMR 585 INSERM / INSA, IMBL, Lyon (Prs Guichardant et Lagarde)
- Laboratoire SPIRALE, Dijon (Dr Prost)
- Société Twydil (Pavesco SA, Suisse) (Messieurs V. et P.Henry)
- Société Hamamatsu (Dr Schloenkofer)
- Laboratoire de physiologie et biologie du sport (LPBS) Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne, Clermont- Ferrand (Prs Fellmann et Coudert)
- Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) (Prs Richard et Lepage)
- Service de physiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège (Pr Lekeux)
- Physiologie Animale, Département de médecine vétérinaire, FUNDP, Namur (Pr Kirschvink)