

Etude transcriptomique de l'expression génique dans les fibres musculaires, induites par l'entraînement et par la course chez le cheval d'endurance

Par :

▪ A. Fraipont^a, D. Votion^b, A.G. Goachet^c, C. Robert^d, E. Van Erck^a, T. Art^a

▪ ^a Département des sciences fonctionnelles, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège.

^b Centre Européen de Cheval de Mont-Le-Soie, Vielsalm.

^c ENESAD, Dijon.

^d ENVA, Maisons-Alfort.

Résumé

Quatre chevaux d'endurance ont été sélectionnés pour évaluer (1) l'effet de l'entraînement et (2) l'effet d'une course d'endurance de 120 km sur l'expression des gènes au sein des cellules musculaires. Des micro-biopsies musculaires ont été réalisées à T0 (après un repos prolongé de plusieurs mois), à C1A (après 10 semaines d'entraînement et avant la course) et à C1P (3 heures après la fin de la course) au niveau du *Gluteus Medius*. Une partie de l'ARN extrait a été hybridée sur des micro-damiers d'expression spécifiques équins et une autre partie a servi pour la réalisation de RT-qPCR de contrôle. L'entraînement a induit une modulation de l'expression de 25 gènes parmi lesquels des gènes témoignant d'une augmentation de la respiration mitochondriale (BDH), de changements morphologiques (VCAN, CHSY1) et de la présence d'état inflammatoire (CTL1). La course a elle aussi induit des modifications géniques importantes (+ de 300 gènes) témoignant notamment d'une augmentation de la biogenèse et respiration mitochondriale (PGC1a, ANT2, MCT2), d'une utilisation plus importante des acides gras (LPL, CD36), d'une modification structurelle et d'une activation des réactions immunes et inflammatoires (PTX3, CD55, PAR3).

Mots clés : cheval, endurance, gènes, micro-damier, exercice

Summary

Four endurance horses were selected to evaluate (1) the training effect, and (2) the effect of a 120km endurance race on the genes expression profile in muscular cells. Muscular microbiopsies were realized in the *Gluteus Medius* at T0 (after several months rest), at C1A (after 10 weeks training, and before the race) and at C1P (3 hours after the completion of the race). One part of the extracted RNA was hybridized on equine specific microarrays, and another part was utilized to realize control RT-qPCR. Training induced a variation of 25 genes expression within genes showing an increase in mitochondrial respiration (BDH), morphological changes (VCAN, CHSY1) and some inflammatory response (CTL1). The race induced also important changes in genes expression (more than 300 genes), showing an increase in mitochondrial respiration and biogenesis (PGC1a, ANT2, MCT2), an increased utilization of fatty acids (LPL, CD36), structural modification and activation of immune and inflammatory responses (PTX3, CD55, PAR3).

Key-words : horse, endurance, genes, microarray, exercise

Introduction

Parmi les disciplines équestres, l'endurance est extrêmement exigeante sur le plan de la condition physique. De nombreuses adaptations physiologiques sont nécessaires pour soutenir ce type d'exercice. La réponse du corps à l'exercice d'endurance a été investiguée pour comprendre les adaptations liées à ce type d'effort particulier et pour éviter les désordres métaboliques apparaissant lors de courses d'endurance. Les chevaux peuvent être disqualifiés pour 2 raisons principales pendant ou après la course : des désordres de type métabolique ou locomoteur. Or il a été suggéré que la fatigue ou la douleur musculaires pouvaient induire une relaxation des structures tendineuses et ligamentaires et donc que la probabilité de boiterie serait plus grande chez un cheval fatigué.

La plupart des chevaux participant à une course d'endurance présentent des taux plasmatiques en enzymes musculaires fortement élevés, souvent plus fortement chez des chevaux éliminés pour raison métabolique (Barrey *et al.*, 2006 ; Schott *et al.*, 2006). Des rhabdomyolyses (myopathies, lésions musculaires) sont également décrites chez des marathoniens ayant des niveaux plasmatiques en enzymes musculaires élevés (Smith *et al.*, 2004). Ce phénomène semble être physiologique chez des chevaux sains lors d'exercice de longue durée : l'augmentation des concentrations sanguines de la créatine kinase (CPK), de l'aspartate aminotransférase (AST) et de la myoglobine serait apparemment due à une augmentation de la perméabilité du sarcolemme (membrane entourant la fibre musculaire). De nombreuses études ont investigué les désordres métaboliques ou structurels apparaissant lors de pathologies musculaires telles que la rhabdomyolyse d'exercice récurrente (RER) et la myopathie de stockage des polysaccharides (PSSM) (Valberg *et al.*, 1999a ; 1999b ; Firshman *et al.*, 2003). La composante génétique de la RER et de la PSSM a également été investiguée au cours d'études de familles (Valberg *et al.*, 1996 ; Dranchak *et al.*, 2005).

Cependant le *primum movens* (c'est-à-dire l'élément déclenchant) et les mécanismes de mise en place de la rhabdomyolyse d'exercice ne sont pas encore élucidés. En complément à la biochimie et l'hématologie sanguines, l'approche génomique pourrait nous aider à mieux comprendre ce type de désordre musculaire chez les chevaux d'endurance. Chaque adaptation physiologique est le résultat de changements métaboliques dans lesquels les protéines de structures et les enzymes sont impliquées. Les synthèses protéiques et les régulations métaboliques sont sous l'influence de gènes qui sont sur- ou sous-exprimés.

L'étude des modulations physiologiques d'expression génique induites par l'entraînement et l'effort chez le cheval d'endurance devrait permettre de mieux comprendre ultérieurement l'apparition de désordres musculaires telle que la rhabdomyolyse d'exercice.

Dans cette étude, les modulations physiologiques d'expression de gènes dans les cellules musculaires de chevaux d'endurance de haut niveau ont été étudiées par microdamier d'expression, dans le but d'évaluer des modifications apparaissant au niveau musculaire chez le cheval d'endurance à l'entraînement et en course et de permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant ces adaptations musculaires. Pour ce faire, 4 chevaux d'endurance ont été sélectionnés pour évaluer (1) l'effet de 10 semaines d'entraînement et (2) l'effet d'une course d'endurance de 120 km.

1. Matériels et méthodes

1.1. Chevaux

Quatre hongres de sang arabe d'endurance âgés de $10,3 \pm 2,2$ ans, mesurant en moyenne $154,8 \pm 3,6$ cm au garrot et pesant, au début du protocole, $448,5 \pm 52,6$ kg ont été sélectionnés parmi 8 chevaux d'endurance suivis lors d'une saison d'entraînement et de courses s'étalant de mars à octobre 2008. Ces chevaux avaient été confiés à l'ENESAD par leur propriétaire et étaient qualifiés pour participer à des épreuves d'endurance de niveau 2 étoiles (** ; 120 à 130 km en 1 journée).

Ils ont intégré les écuries de l'ENESAD en mars 2008 où ils étaient logés en box individuels, sur copeaux, et avaient un accès quotidien (de 9h à 17h) à un paddock individuel. Tous les chevaux ont été soumis à un examen clinique complet incluant un examen de l'appareil locomoteur dès leur entrée dans le protocole afin de s'assurer qu'ils étaient cliniquement sains. Cet examen était répété 1 fois par semaine durant toute la durée du protocole.

Les chevaux ont reçu une alimentation équilibrée à base de foin de prairie naturelle et d'aliment concentré granulé, chacun étant distribué en 2 repas par jour. Les quantités distribuées ont été adaptées à chaque cheval en fonction de l'évolution de son poids et de sa note d'état corporel.

1.2. Protocole

Après une phase d'habituation d'un mois, à T0, les chevaux ont été soumis à une série d'examen complémentaires (analyses hémato-biochimiques, analyse de digestibilité de la ration, échocardiographie Doppler et analyse d'électrocardiogramme, test de fonction pulmonaire (IOS = oscillométrie à impulsions forcées), endoscopie et prélèvements respiratoires,...) ainsi qu'à des micro-biopsies musculaires. Ces micro-biopsies musculaires ont donc été prises au temps T0, c'est-à-dire après une mise au repos de 5 mois en moyenne.

Ensuite, les chevaux étaient entraînés pendant 10 semaines, au terme desquelles, la même série d'examen complémentaires était réalisée ainsi que des micro-biopsies musculaires. Ces biopsies étaient ainsi réalisées au temps de prélèvement C1A, ce qui correspondait donc au prélèvement post-entraînement, mais également au prélèvement précédant 1 course d'endurance de 119km (course réalisée 10 jours après les prélèvements).

Trois heures après l'achèvement de la course, la même série d'examen complémentaires et micro-biopsies musculaires étaient réalisées (temps de prélèvement C1P).

1.3. Entraînement et course

Les chevaux ont tous été entraînés suivant le même protocole sous la direction d'un même entraîneur. L'entraînement consistait en une sortie montée de 2 heures à 10 km/h en moyenne 3 fois par semaine. Les chevaux effectuaient un travail en terrain varié, au pas et au trot, avec de petites phases de galop. Une séance de galop sur piste (2x20 km à 18 km/h en moyenne) a été réalisée 3 semaines avant la course ; cet entraînement ayant pour objectif de préparer les chevaux à une épreuve de 119 km.

Cette épreuve de CEI** s'est déroulée en France en juin 2008 en 4 boucles avec un temps de repos imposé entre les boucles de 40, 40 et 50 minutes respectivement entre les boucles 1 et 2, 2 et 3, et 3 et 4, et un dénivelé total d'environ 350m.

1.4. Micro-biopsies musculaires

Les sites de prélèvement des micro-biopsies musculaires ont été alternés selon les temps de prélèvements : 2 chevaux prélevés au niveau du *Gluteus Medius* (GM, donc au niveau de la croupe) gauche à T0, au niveau du GM droit à C1A et à nouveau au niveau du GM gauche à C1P, les 2 autres chevaux suivant le même schéma mais en commençant par le GM droit à T0. Les sites de prélèvement ont été déterminés de façon précise pour le GM (sur une ligne rejoignant la pointe de la hanche à la base de la queue, au 1/3 de la distance), rasés, aseptisés, insensibilisés à l'aide d'un anesthésique local et incisés sur quelques mm. Les micro-biopsies ont été réalisées avec des aiguilles à biopsies 14G (Pro-Mag Biopsy Needle, Angiotech) et un pistolet à biopsies (Pro-Mag Ultra, Angiotech), perpendiculairement à la peau à 5 cm de profondeur.

Plusieurs biopsies (d'une vingtaine de mg chacune) ont été prélevées par site et directement plongées dans du RNALater, conservées à température ambiante pendant 2h puis placées à 4°C 24h et ensuite conservées à -80°C.

1.5. Extraction de l'ARN musculaire

L'extraction de l'ARN musculaire a été réalisée selon la méthode d'extraction complète au TRIzol® suivie d'une purification sur colonne Qiagen RNeasy®.

Les échantillons, à -80°C, étaient dégelés à température ambiante (RT) pendant 1 heure, ensuite les biopsies étaient retirées du RNALater et introduites dans un ependorf (RNase free) contenant 1ml de TRIzol. Les cellules étaient alors lysées et homogénéisées à l'aide du Tissue Lyser®.

Les échantillons étaient ensuite traités comme préconisé par le fabricant (TRIzol® Reagent, registered trademark of Molecular Research Center, Inc.). A la fin de la procédure, le surnageant était éliminé et le culot d'ARN était re-dissout dans 100 µl d'eau RNase free.

L'ARN dissout était traité selon la méthode de « RNA cleanup » du kit d'extraction Qiagen RNeasy Mini Kit® (selon la technique préconisée par le fabricant) avec une phase de traitement à la DNase afin d'éviter toute contamination de l'ARN par de l'ADN. A la fin de la procédure, l'ARN était re-dissout dans 35 µl d'eau RNase Free fournie dans le kit d'extraction.

Les qualité et quantité ont été vérifiées à l'aide d'un Nanodrop® et d'un Bioanalyser®.

1.6. Description du micro-damier

Le contenu du Horse Gene Expression Microarray (Agilent® Technologies, Palo Alto, CA) a été fourni par RefSeq, Unigene, UCSC mRNA, Ensembl, EntrezGene and UCSC equLab1. Le nombre total de puits sur

le damier est de 45 220, dont 43 803 représentent des sondes mesurant l'expression génique ; le reste des puits servant de contrôles à Agilent®.

1.7. Amplification et hybridation de l'ARN

L'hybridation sur le micro-damier Agilent® a été réalisée selon un mode mono-couleur utilisant une coloration avec de la cyanine-3 (Cy3). Une puce entière était utilisée pour chaque cheval.

L'amplification de l'ARN, l'hybridation des sondes, les protocoles de lavage et la lecture des puces ont été réalisés par la plate-forme Agilent® de l'Université de Louvain (Microarray Facility, VIB, Leuven).

1.8. Analyse statistique des résultats du micro-damier

1.8.1 Pré-traitement des données

L'analyse a été basée sur l'expression de valeurs suivant le programme Agilent® Feature Extraction (FE) Software version 10.1.1.1 (notamment suivant le gProcessedSignal pour l'intensité du signal Cy3).

Une étape de normalisation des données a été réalisée en transformant les valeurs d'intensité lumineuse du gProcessedSignal en logarithme en base 2 (\log_2), afin de normaliser les intensités entre chaque damier. Après cette étape de normalisation, la distribution du signal pour chaque sonde sur le damier était identique pour chaque hybridation. Ce sont donc les valeurs d'intensités normalisées qui ont été utilisées pour les analyses suivantes.

Les contrôles Agilent® ont été retirés avant toute analyse statistique. Les signaux de sondes ayant une intensité inférieure au seuil d'intensité de fond ont également été retirés de l'analyse. Au final un nombre total de 43 049 sondes ont été retenues pour l'analyse statistique.

1.8.2 Sélection des gènes exprimés différemment

Les valeurs d'intensité normalisées ont été comparées pour les différentes conditions (effet de 10 semaines d'entraînement (T0 vs C1A) et effet d'une course de 120km (C1A vs C1P)) selon le programme *Limma* de Bioconductor (www.bioconductor.org).

Pour voir si les intensités étaient significativement différentes selon les conditions, un test de t modéré a été utilisé. Une valeur de p inférieure à 0,001 et un « fold-change » supérieur à 2 ($-1 > \log_2 > 1$) ont été fixés.

1.8.3 RT-qPCR de confirmation

Les échantillons d'ARN musculaire des 4 chevaux (C1A et C1P) ont été utilisés pour la réalisation d'une RT-qPCR de contrôle. Une première qPCR a été réalisée afin de déterminer les meilleurs gènes de références parmi plusieurs gènes choisis dans la littérature (HPRT, R18s, SDHA et NSUN6). Les programmes Normfinder et Genorm ont estimé NSUN6 et SDHA comme les meilleurs gènes de références (gènes ménagers). Ensuite quelques PCR ont été réalisées sur des gènes d'intérêt afin de confirmer les résultats du micro-damier.

2. Résultats

2.1. Chevaux et course

Les 4 chevaux testés pesaient en moyenne $448,5 \pm 52,6$ kg à T0, $438,8 \pm 63,7$ kg à C1A et $421,6 \pm 67,3$ kg à C1P (perte de poids due essentiellement à la déshydratation et à la réduction de la masse viscérale).

Les résultats des prises de sang à T0, C1A et C1P sont présentés dans le tableau 1 en ce qui concerne les protéines totales (PT), les taux de leucocytes et de neutrophiles, le fibrinogène et l'haptoglobine ainsi que les enzymes musculaires représentées par la créatine kinase (CK).

Les résultats des autres paramètres biochimiques (tels que les paramètres du stress oxydant par exemple) et cliniques ne sont pas exprimés ici et font partie d'autres études.

Les 4 chevaux ont terminé la course de 119km à une vitesse moyenne de $15,6 \pm 1,9$ km/h. La température moyenne était de 25°C, le temps était sec et ensoleillé, le terrain était bon, généralement plat avec quelques côtes.

Tableau 1 : Valeurs héματο-biochimiques de 4 chevaux d'endurance (exprimées en moyenne \pm déviation standard) prélevés à T0 (après une période de repos et avant entraînement), à C1A (après 10 semaines d'entraînement et avant une course de 120km) et à C1P (2h après une course de 120km)

Table 1: Haemato-biochemical values taken on 4 endurance horses (expressed as means \pm standard deviation) at T0 (at rest, on untrained horses), at C1A (after 10 weeks training, and before race) and at C1P (2h post race)

	Unités	Temps T0	Temps C1A	Temps C1P
Hématocrite	%	35,7 \pm 4,10	38,7 \pm 2,23	44,1 \pm 2,27
Erythrocytes	/dm ³	7,67 \pm 0,65	7,95 \pm 0,76	9,21 \pm 0,15
Leucocytes	10 ³ /mm ³	6,80 \pm 1,15	7,05 \pm 0,75	15,64 \pm 3,11
Neutrophiles	10 ³ /mm ³	3,98 \pm 1,06	3,83 \pm 1,15	12,83 \pm 3,32
Lymphocytes	10 ³ /mm ³	2,23 \pm 0,93	2,89 \pm 0,49	2,27 \pm 1,28
Protéines totales	g/l	67,73 \pm 3,28	75,73 \pm 2,08	81,38 \pm 1,67
Sodium	mmol/l	136 \pm 1,73	139 \pm 2,75	133 \pm 0,58
Potassium	mmol/l	4,28 \pm 0,43	4,80 \pm 0,14	6,05 \pm 0,78
Chlore	mmol/l	99,5 \pm 1,29	94,5 \pm 2,08	84,8 \pm 3,50
Calcium	mg/l	ND	122 \pm 4,76	130 \pm 7,18
Fibrinogène	g/l	1,60 \pm 0,13	2,29 \pm 0,29	2,43 \pm 0,31
Haptoglobine	mg/l	1,34 \pm 0,16	1,43 \pm 0,27	1,07 \pm 0,03
Créatine kinase	UI/l à 30°C	231 \pm 97,4	224 \pm 82,2	1155 \pm 559
Aspartate amino transférase	UI/l à 30°C	193 \pm 15,0	273 \pm 102	350 \pm 88,2
Lactate déshydrogénase	UI/l à 30°C	541 \pm 81,7	630 \pm 107	1051 \pm 353
Urée	g/l	0,30 \pm 0,04	0,49 \pm 0,12	0,79 \pm 0,08
Créatinine	mg/l	12,1 \pm 1,48	16,5 \pm 2,17	19,6 \pm 0,62

2.2. Qualité et quantité d'ARN musculaire, hybridation sur microarray

La quantité d'ARN obtenue était en général d'environ 4 μ g par biopsie (concentration moyenne en ARN de 101,5 \pm 44,29 ng/ μ l), les rapports 260/280 et 260/230 (évaluant la pureté des échantillons, l'acide nucléique ayant une absorbance à 260nm, les protéines à 280nm, et divers composés organiques tel que le phénol à 230nm) étaient d'environ 1,8 et 1,2 respectivement et le RQI (score global de qualité) ou RIN (RNA Integrity Number) de 8,6 en moyenne.

L'hybridation sur microarrays des échantillons musculaires a été réalisée avec un pourcentage d'hybridation correct de 88%.

2.3. Expression génique modifiée par l'entraînement

En combinant une valeur de $p < 0,001$ et un "fold-change" supérieur à 2, 13 sondes apparaissent (correspondant à 11 gènes différents) sous-exprimées et 14 surexprimées (correspondant à 14 gènes différents) après 10 semaines d'entraînement (comparaison C1A vs T0).

Le nom des gènes différemment exprimés, ainsi que le nombre de fois que leur expression est augmentée ou diminuée après entraînement sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Gènes différemment exprimés après 10 semaines d'entraînement de type endurance
Table 2: Genes differential expression after 10 weeks of endurance training

Functional category	Gene symbol	Gene name	Fold change (log2)	P value
Glucose/lipid metabolism	BDH	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 1	3,24	3,08 ^E -05
	KCNJ11	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel	1,39	0,00049
	GYS1	Glycogene synthase (liver)	-1,81	0,00099
Protein metabolism	GNMT	Glycine-N-methyltransferase	1,18	0,00085
	FTCD	Formiminotransferase cycloaminase	-1,99	4,90 ^E -05
	TYR	Tyrosinase	-1,85	0,00028
Inflammation/immunity	CLP	Coactosin-like protein 1 (COTL1)	1,32	0,00075
Extracellular matrix	VCAN	Versican core protein precursor	2,80	8,30 ^E -05
	CHSY1	Chondroïtine sulfate synthase 1	1,71	0,00011
Cellular homeostasis/transport	FTL	Ferritine L subunit	1,60	4,89 ^E -05
	KCNJ11	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel	1,39	0,00049

Cellular proliferation, growing and messaging, membrane trafficking, angiogenesis	IQCG	IQ-motif containing protein G	1,99	0,00097
	SAMD7	Sterile alpha motif domain-containing protein 7	1,91	0,00024
	CHSY1	Chondroitine sulfate synthase 1	1,71	0,00011
	CIB4	Calcium and integrin binding family member 4	1,66	1,89 ^E -06
	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	1,24	0,00038
	Copine 4	Calcium-dependent phospholipid-binding protein 4	-1,53	0,00076
	OR11G2	Olfactory receptor, family 11, subfamily G, member 2	-1,21	0,00096
	ENPP2	Ectonucleotide pyrophosphate/phosphodiesterase 2	-1,21	6,70 ^E -05
Cellular differentiation and growing	ID1	DNA-binding protein inhibitor 1	-1,6	0,00085
Apoptosis	SAMD7	Sterile alpha motif domain-containing protein 7	1,91	0,00024

2.4. Expression génique modifiée par la course

En combinant une valeur de $p < 0,001$ et un "fold-change" supérieur à 2, 101 sondes apparaissent sous-exprimées et 414 surexprimées après 120 km de course (plusieurs sondes correspondant parfois au même gène).

Le tableau 3 reprend les gènes ayant le plus varié, qui seront discutés par la suite et dont la fonction est déjà connue (en effet de nombreux gènes ayant été significativement modifiés par la course n'ont pas encore de rôle connu).

Les résultats de la RT-qPCR correspondent à ceux du micro-damier d'expression quant à l'effet de la course sur l'expression des gènes étudiés.

Tableau 3 : Gènes différemment exprimés 3 heures après une course d'endurance de 120km
Table 3: Genes differential expression three hours after a 120km endurance race

Functional category	Gene symbol	Gene name	Fold change (log2)	P value
Métabolisme énergétique du glucose et des graisses	PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, noncatalytic, γ 2	5,41	0,00037
	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	5,20	0,00024
	RETN	Resistin	4,84	0,00084
	MCT2	monocarboxylate transporter 2	2,97	0,00019
	PGC1	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator	2,72	0,00010
	IRS-2	insulin receptor substrate 2	2,59	0,00043
	FOXO1	forkhead box protein O1	2,40	0,00024
	SLC25A2/ANT2	ADP/ATP translocase (2)	1,93	
	LPL	lipoprotein lipase	1,91	0,00078
	NPC1	Niemann pick C1 protein	1,66	0,00048
	HMGCR	3-alpha-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	1,23	0,00075
	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	-1,22	0,00076
	Métabolisme protéique	TRIM63	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM 63	3,68
FBXO32		F-box protein 32	3,61	0,00021
KLF15		Kruppel-like factor 15	2,63	0,00092
CSP1		Calcipressin-1	2,58	0,00045
SDC3		syndecan-3	1,80	0,00058
MEF2C		myocyte-specific enhancer factor 2C	-1,58	0,00045
Gestion de l'ADN (endommagé)	OBFC2A	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold-containing protein A2	3,37	0,00019
	DDIT4L	DNA damage-inducible transcript 4-like	2,29	0,00044
	REV3L	DNA polymerase zeta catalytic subunit	1,37	0,00016

Différenciation cellulaire	ERR3	estrogen-related receptor gamma transcript variant 3	3,76	0,00047	
	WFDC1/PS20	WAP 4-disulfide core domain protein 1 precursor	3,73	0,00021	
	MafF	Transcription factor MafF	2,90	0,00074	
	ERRFI1/MIG6	ERBB receptor feedback inhibitor 1	2,28	0,00010	
	CAD	CAD protein	2,13	0,00023	
	FAM134B	Protein FAM 134B	1,85	0,00020	
	HSF2BP	heat shock transcription factor 2 binding protein	-1,02	0,00034	
Apoptose	CFLAR	CASP8- and FADD-like apoptosis regulator	2,71	0,00045	
	FOXO1	forkhead box protein O1	2,40	0,00024	
	EFHC9	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 9	2,07	0,00023	
Migration cellulaire	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5	1,41	0,00016	
	ITGA1	integrin alpha-1 chain	1,37	0,00011	
Messages cellulaires	RGS20	regulator of G protein signaling 20	3,00	0,00053	
	ADM	Adrenomedullin	2,18	0,00049	
	STARS	actin-binding Rho-activating protein	2,13	0,00018	
	DNAJB4	DNAJ/HSP40 homolog, subfamily B, member 4	1,85	0,00019	
	GNA13	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	1,72	0,00021	
	CREM	cAMP-responsive element modulator	1,61	0,00030	
	RAMP3	receptor activity-modifying protein 3 precursor	1,51	0,00026	
Gestion de la matrice extracellulaire	MMP3	matrix metalloproteinase 3	3,85	0,00027	
	TIMP4	metalloproteinase inhibitor 4 precursor	1,97	0,00015	
	SYNJ2	Synaptojanin-2	1,92	0,00099	
Fonction neurologique	5HTT/SLC6A4	serotonin transporter	2,80	0,00003	
Fonction immunité gestion de l'inflammation et du stress oxydant	PTX3	pentraxin-related protein PTX3 precursor	4,59	0,00007	
	DEFB1	Beta defensin 1	4,51	0,00045	
	OTU1	ubiquitin thioesterase OTU1	2,67	0,00030	
	DEFB3	Beta defensin 3	2,59	0,00026	
	PAR 3	protease activated receptor 3	2,40	0,00050	
	MT-1A	Metallothionein-1A	1,90	0,00004	
	CD55	Complement decay-accelerating factor (CD55 antigen)	1,68	0,00054	
	CD36/GP4	platelet glycoprotein IV	1,65	0,00060	
	ZIP14	zinc transporter ZIP14	1,54	0,00075	
	CXCL1	chemokine, CXC motif, ligand 1	1,52	0,00069	
	CD38	ADP-ribosyl cyclase	1,49	0,00075	
	DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3	1,20	0,00047	
	NKAP	NFKB-activating protein/ putative MAPK-activating protein PM08	-1,99	0,00016	
	IFI30/GILT	gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	-1,31	0,00016	
	Homéostasie cellulaire, transport intra/inter cellulaire	SLC22A4	organic cation transporter 1	3,55	0,00013
ATP1A1		ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	3,18	0,00021	
SLC25A33		Solute carrier family 25 member 33	2,75	0,00019	
CACNL1A4		transmembrane 4L6 family member 18	2,00	0,00026	

3. Discussion

3.1. Chevaux et course

Les 4 chevaux prélevés ont tous parcouru la même distance à un rythme similaire. Ils ne boitaient pas après la course, ni ne présentaient de raideur particulière.

Les valeurs d'enzymes musculaires étaient augmentées après la course, mais de façon habituelle pour ce type d'exercice. Ils ont également présenté une hémococoncentration avec une déshydratation et une perte en électrolytes importantes mais restant dans les normes pour l'effort demandé. On peut également observer une augmentation du taux de leucocytes totaux due à l'augmentation du nombre de neutrophiles, malgré une baisse du taux de lymphocytes (typique en post-effort intense tel qu'une course d'endurance).

Les micro-biopsies musculaires ont été réalisées avant la course dans le GM gauche pour 2 chevaux et dans le GM droit pour les 2 autres chevaux et les biopsies post-course ont été réalisées dans le GM opposé pour chaque cheval, ceci afin d'éviter un éventuel impact de l'allure (par exemple si le cheval préfère galoper à gauche qu'à droite) mais également un effet de la biopsie précédente (éviter une éventuelle inflammation apparaissant après la biopsie d'avant course).

Les micro-biopsies ont très bien été tolérées et n'ont eu aucun impact négatif sur la locomotion ni sur l'état général des chevaux.

3.2. Gènes modifiés par l'entraînement

La réponse adaptative à l'entraînement est dépendante des variations induites par l'exercice sur les mécanismes de contraction du muscle, les besoins en énergie et les flux de calcium. L'entraînement de type endurance résulte en une augmentation de la capacité aérobie, de la biogenèse mitochondriale et une dérive du métabolisme des hydrates de carbone vers les acides gras, alors que l'entraînement de type résistance promeut la synthèse protéique, l'hypertrophie musculaire et un changement des fibres musculaires lentes vers les fibres rapides.

Des études sur humains ou sur animaux ont démontré que des changements dans l'expression d'une grande variété d'ARN messagers (ARNm) jouent un rôle majeur dans la récupération au niveau musculaire post-exercice, avec l'expression de la plupart des gènes retrouvant des valeurs basales dans les 24h (Bickel *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2005 ; Pilegaard *et al.*, 2003 ; Mahoney *et al.*, 2005). Cependant, il apparaît que des épisodes répétés d'exercice conduisent à un nouveau niveau basal d'expression génique dans le muscle au repos. Des taux plus élevés en gènes mitochondriaux et en gènes impliqués dans le métabolisme énergétique ont ainsi été observés chez des athlètes suivant un entraînement de type endurance par rapport à des sujets sédentaires (Puntschart *et al.*, 1995).

Dans cette étude, une augmentation de l'**utilisation des corps cétoniques** (et des acides gras) et une amélioration de la **respiration mitochondriale** par la cellule musculaire sont reflétées par l'augmentation du gène codant pour la **3-hydroxybutyrate dehydrogénase de type 1** (enzyme liée à la membrane interne des mitochondries qui catalyse la transformation de D-β-hydroxybutyrate en acétoacétate qui sera par la suite transformé en acétyl-CoA utilisé par la chaîne de l'oxygène). Cette augmentation au niveau génique peut même se retrouver au niveau protéique, vu que dans une étude réalisée par Nie et collaborateurs en 2010, les taux de BDH sanguins étaient plus élevés au repos chez des athlètes à l'entraînement plutôt que chez des personnes avec peu d'activité physique.

Une amélioration de la **protection de la cellule musculaire** contre les stress métaboliques est observée (augmentation de l'expression de **KCNJ11** et **FTL**, agissant en partie contre le stress oxydant).

Une induction de l'**angiogenèse, de la prolifération, de la différenciation, et de la migration cellulaires** est reflétée par la surexpression ou la sous-expression de **VCAN**, **CHSY1**, **CIB**, **FGD6**, **ENPP2** et **ID-1**, suggérant une augmentation de la densité en capillaires et une réorganisation structurelle des fibres musculaires.

Des gènes impliqués dans les **réponses immune et inflammatoire** se sont retrouvés surexprimés, notamment celui codant pour la **coactosin-like protein 1** qui, en interagissant avec la 5-lipoxygénase (5LO), induit une augmentation de formation de leukotriènes pro-inflammatoires.

Une étude menée sur l'effet de 10 mois d'entraînement chez des jeunes pur-sang anglais a également démontré un taux basal d'expression génique modifié, impliquant notamment des gènes ayant un rôle dans le métabolisme énergétique (oxydation des acides gras, beta-oxydation, cycle de l'acide tricarboxylique, etc) et l'immunité (Mc Givney *et al.*, 2010).

3.3. Gènes modifiés par la course

Un épisode unique d'exercice intense induit de nombreux stress au niveau des muscles squelettiques, dont une demande accrue en ATP (énergie) et un stress mécanique (Martineau *et al.*, 2001). Les

réponses à ces stress peuvent être divisées en 2 catégories : le retour à l'homéostasie, et la réponse adaptative. Les principaux processus associés au retour à l'homéostasie (équilibre de fonctionnement) sont l'épargne du glucose, une oxydation des graisses élevée, une gestion des radicaux libres ainsi qu'une réparation des dommages engendrés par ces radicaux libres, et une restauration du pH et des concentrations en électrolytes cellulaires (Pilegaard *et al.*, 2000 ; Green 2004 ; Richter *et al.*, 2001). Comme nous en avons parlé ci-dessus, la réponse adaptative est le processus par lequel le muscle répond à des épisodes répétés d'exercice (entraînement) dans le but d'améliorer sa capacité à maintenir l'homéostasie durant l'exercice. Cette réponse implique des changements morphologiques et métaboliques tels que ceux cités précédemment.

De nombreuses études se sont attachées à démontrer que la réalisation d'un effort induisait une augmentation de l'expression de gènes, particulièrement ceux impliqués dans la biogenèse mitochondriale et le métabolisme (Hoppeler *et al.*, 2007).

Dans cette présente étude, l'expression de nombreux gènes impliqués dans le **métabolisme énergétique** a été modulée afin de retrouver une homéostasie au niveau énergétique. Les modifications induites par les nombreux gènes surexprimés vont dans le sens d'une **épargne du glucose**, en favorisant l'oxydation et l'importation au sein des cellules des acides gras, en augmentant la néoglucogenèse, la lipolyse, la biogenèse mitochondriale (surexpression de PGC1a, FOXO1, MCT2, IRS2, CD36, LPL, NR4A3, resistin, NPC1, HMGCR, ANT2, KLF15,...).

D'autres gènes, intervenant dans le **métabolisme des protéines** et les **changements morphologiques**, ont vu leur expression modifiée par la course dans le sens d'un **catabolisme des protéines** (pas d'hypertrophie des fibres musculaires !) : il s'agit de TRIM63, FBXO32, CSP1 et KLF15, surexprimés et de MEF2C, sous-exprimé. Une modulation de la **matrice extracellulaire** (ME) semble être induite par la course. Des gènes impliqués dans la dégradation de la ME et la **réparation des dommages musculaires** apparaissent surexprimés (MMP3, SYNJ2). Des gènes régulateurs de l'**apoptose** ont également vu leur expression modulée. Des gènes impliqués dans les **mouvements et la migration cellulaires** ont été surexprimés après course. Il s'agit de SDC3 qui induit la formation de structures ressemblant à de longs filaments et qui organise le cytosquelette d'actine, de NFAT5 qui augmente la migration cellulaire.

De nombreux gènes impliqués dans le **maintien de l'homéostasie cellulaire, les messages et les transports intra/inter-cellulaires** sont surexprimés après la course (SLC25A33, ATP1A1, CACNL1A4, RAMP3, RGS20, CREM, DNAJB4, HSF2BP, ADM).

Il y a aussi surexpression de nombreux gènes impliqués dans la **réparation de l'ADN endommagé** (dont REV3L, OBFC2A, DDIT4L).

De très nombreux gènes impliqués dans la **fonction immune, l'inflammation et la gestion du stress oxydant** (MT-1A, CSP1, FOXO1) ont également vu leur expression modifiée par la course. Ces variations d'expression allant généralement dans le sens d'une augmentation de la réponse immune et inflammatoire (DEFB1 et 3, CD55, PTX3, ZIP14, DNAJC3, OTU1, CXCL1 et PAR3).

La course d'endurance a donc induit une variation d'expression d'un nombre important de gènes, dont notamment, et surtout, les gènes impliqués dans le métabolisme des sucres et des graisses (avec une augmentation de la biogenèse et de la respiration mitochondriale, et une importation plus importante des graisses dans les cellules musculaires) mais également des gènes témoignant d'une modification structurelle au niveau musculaire, de l'existence d'un état inflammatoire et de stress oxydant (ainsi que de dommages à l'ADN), d'une stimulation de l'immunité et de transports cellulaires augmentés tendant à maintenir l'homéostasie. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus lors d'une précédente étude portant sur la réalisation d'un effort intense par de jeunes pur-sang (McGivney *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré dans de nombreuses études que la plupart des variations d'expression génique adaptatives liées à la réalisation d'un effort semblaient assez fugace, et qu'elles retournaient à des valeurs basales 24 heures après l'effort.

L'entraînement a eu moins d'effet sur les variations d'expression génique basale que la course. Il y a aussi moins de gènes significativement modifiés que lors d'une étude menée sur des jeunes pur-sang. Mais ceci peut s'expliquer par le fait que d'une part la période d'entraînement des pur-sang était plus longue (10 mois vs 10 semaines), et d'autre part par le fait que nos chevaux d'endurance étaient des chevaux matures, qui avaient déjà été entraînés auparavant (puisque 3 chevaux étaient déjà qualifiés sur 120 km et 1 cheval l'était sur 90km) alors que les pur-sang utilisés dans l'étude de McGivney et collaborateurs (2010) étaient des jeunes chevaux de 2 ans sans aucun entraînement.

En conclusion, ces études transcriptomiques par micro-damiers d'expression et par qPCR ont permis d'établir que l'entraînement et l'effort induisent des modifications de l'expression de gènes responsables du métabolisme mitochondrial, du remodelage tissulaire, de la gestion du stress oxydatif et inflammatoire, de la migration cellulaire, etc... Les effets de l'effort sont particulièrement remarquables, se traduisant par la modulation de plus de 300 gènes (sur- ou sous-exprimés).

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les Haras Nationaux pour leur soutien financier, les propriétaires pour le prêt des chevaux ainsi que l'entraîneur, les cavaliers et membres des intendances.

Références

- Barrey E., Mucher E., Robert C., Amiot F., Gidrol X. 2006. Gene expression profiling in blood cells of endurance horses completing competition or disqualified due to metabolic disorder. *Equine Vet. J. Suppl* 36, 43-49.
- Bickel C.S., Slade J., Mahoney E., Haddad F., Dudley G.A., Adams G.R. 2005. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. *J Appl Physiol* 98(2), 482-488.
- Dranchak P.K., Valberg S.J., Onan G.W., Gallant E.M., MacLeay J.M., McKenzie E.C., De La Corte F.D., Ekenstedt K., Mickelson J.R. 2005. Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc.* 1;227(5), 762-7.
- Firshman A.M., Valberg S.J., Bender J.B., Finno C.J. 2003. Epidemiologic characteristics and management of polysaccharide storage myopathy in Quarter Horses. *Am J Vet Res* 64(10), 1319-27.
- Green H.J. 2004. Membrane excitability, weakness, and fatigue. *Can J Appl Physiol* 29(3), 291-307.
- Hoppeler H., Klossner S., Fluck M. 2007. Gene expression in working skeletal muscle. *Adv Exp Med Biol* 618, 245-254.
- Mahoney D.J., Parise G., Melov S., Safdar A., Tarnopolsky M.A. 2005. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J* 19(11), 1498-1500.
- Martineau L.C., Gardiner P.F. 2001. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension. *J Appl Physiol* 91(2), 693-702.
- McGivney B., Eivers S.S., MacHugh D.E., *et al.* 2009. Transcriptional adaptations following exercise in Thoroughbred horse skeletal muscle highlights molecular mechanisms that lead to muscle hypertrophy. *BMC Genomics*, Dec 30;10:638. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/638>
- McGivney B., McGettigan P.A., Browne J.A., *et al.* 2010. Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. *BMC Genomics*, Jun 23; 11:398. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/398>
- Nie J., Tong T.K., George K., Fu F.H., Lin H., Shi Q. 2010. Resting and post-exercise serum biomarkers of cardiac and skeletal muscle damage in adolescent runners. *Scand J Med Sci Sports* Mar 10 (Epub ahead of print).
- Pilegaard H., Ordway G.A., Saltin B., Neufer P.D. 2000. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(4), E806-814.
- Pilegaard H., Saltin B., Neufer P.D. 2003. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546(Pt 3), 851-858.
- Puntschart A., Claassen H., Jostarndt K., Hoppeler H., Billeter R. 1995. mRNAs of enzymes involved in energy metabolism and mtDNA are increased in endurance-trained athletes. *Am J Physiol* 269(3 Pt 1), C619-625.
- Richter E.A., Derave W., Wojtaszewski J.F. 2001. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol* 535(Pt 2), 313-322.
- Schott H.C. II, Marlin D.J., Geor R.J., *et al.* 2006. Changes in selected physiological and laboratory measurements in elite horses competing in a 160 km endurance ride. *Equine Vet. J. Suppl* 36, 37-42.
- Smith J.E., Garbutt G., Lopes P., Pedoe D.T. 2004. Effects of prolonged strenuous exercise (marathon running) on biochemical and haematological markers used in the investigation of patients in the emergency department. *Br. J. Sports Med* 38, 292-294.
- Valberg S.J., Geyer C., Sorum S.A., Cardinet G.H. 3rd. 1996. Familial basis of exertional rhabdomyolysis in quarter horse-related breeds. *Am J Vet Res* 57(3), 286-90.
- Valberg S.J., Mickelson J.R., Gallant E.M., MacLeay J.M., Lentz L., de la Corte F. 1999. Exertional rhabdomyolysis in quarter horses and thoroughbreds: one syndrome, multiple aetiologies. *Equine Vet J Suppl* 30, 533-8.
- Valberg S.J., Macleay J.M., Billstrom J.A., Hower-Moritz M.A., Mickelson J.R. 1999. Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with 'tying-up' due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet J* 31(1), 43-7.
- Yang Y., Creer A., Jemiolo B., Trappe S. 2005. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 98(5), 1745-1752