

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	9
1 TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE : ETUDE GENETIQUE DES RHABDOMYOLYSES... 11	11
1.1 RAPPELS PHYSIOLOGIQUES	11
1.1.1. TYPOLOGIE MUSCULAIRE.....	11
1.1.2. METABOLISME	14
1.1.2.1 La voie aérobie avec la glycolyse et le cycle de Krebs.....	14
1.1.2.2 Les voies anaérobies lactique et alactique.....	18
1.1.3. PATHOLOGIES MUSCULAIRES	18
1.1.3.1 Les glycogénoses	18
1.1.3.2 L'hyperthermie maligne.....	19
1.1.3.3 La myopathie atypique.....	20
1.1.3.4 La rhabdomyolyse d'exercice asymptomatique.....	20
1.1.3.5 La paralysie hyperkaliémique périodique	21
1.1.3.6 La myotonie	21
1.1.3.7 La dystrophie myotonique.....	21
1.1.3.8 La myopathie mitochondriale	21
1.1.3.9 La myopathie fibreuse.....	22
1.2 RHABDOMYOLYSES A L'EFFORT.....	22
1.2.1. EPIDEMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC	22
1.2.2. PHYSIOPATHOLOGIE.....	23
1.2.3. DIAGNOSTIC CLINIQUE ET TRAITEMENT	24
1.3 LA CARTE GENETIQUE CHEZ LE CHEVAL.....	26
1.3.1. LE SEQUENÇAGE DU GENOME DU CHEVAL.....	26
1.3.2. LES GENES CANDIDATS IDENTIFIES DANS D'AUTRES ESPECES.....	26
1.3.2.1 Le gène du récepteur à la ryanodine du muscle squelettique.....	26
1.3.2.2 Le gène CPT II.....	27
1.3.2.3 Le gène de la myosine MHC IIa	27
1.3.2.4 Le gène CPT2.....	27
1.3.2.5 Le gène de l'enzyme de branchage pour le glycogène (GBE).....	28
1.3.2.6 Le gène SCN4A	28
1.3.2.7 Le gène GYS1	28
1.3.2.8 Les gènes mitochondriaux.....	28
1.3.3. LES PUCES ADN OU MICROARRAY OU DAMIER ADN.....	29

1.3.3.1	Principe	29
1.3.3.2	Différents types de puces ADN.....	29
1.3.3.2.1	Les puces à ADNc.....	29
1.3.3.2.2	Les puces à Oligonucléotides.....	29
1.3.3.3	Applications génétiques.	30
1.3.3.4	Une puce oligonucléotide équine.....	30

2 TRAVAIL EXPERIMENTAL : MISE EN EVIDENCE DES GENES RESPONSABLES DE RHABDOMYOLYSES..... 33

2.1	VALIDATION DE LA METHODE UTILISEE	33
2.1.1.	ANIMAUX MATERIELS ET METHODE.....	33
2.1.1.1	Chevaux et biopsies musculaires	33
2.1.1.2	Extraction de l'ARN total	35
2.1.1.3	Amplification d'ARN	36
2.1.1.4	Reverse transcription.....	37
2.1.1.5	Production des puces à ADNc.....	38
2.1.1.6	Hybridation	39
2.1.1.6.1	Test inter-spécifique.....	40
2.1.1.6.2	Test de reproductibilité	40
2.1.1.6.3	Test biologique de comparaison musculaire	40
2.1.1.6.4	Méthode d'hybridation: protocole d'hybridation adaptée par Benchaouir <i>et al.</i> , 2004.	40
2.1.1.7	Analyses des données.....	41
2.1.1.7.1	Analyse des images.....	41
2.1.1.7.2	Filtrage des gènes significatifs et statistiques	42
2.1.2.	RESULTATS.....	42
2.1.2.1	Test inter-spécifique.....	42
2.1.2.2	Test de reproductibilité	43
2.1.2.3	Test de comparaison musculaire	44
2.2	APPLICATION AVEC DES CHEVAUX ATTEINTS DE RHABDOMYOLYSES.....	47
2.2.1.	ANIMAUX MATERIEL ET METHODE	47
2.2.1.1	Les animaux	47
2.2.1.2	Utilisation d'une puce hybride.....	48
2.2.1.3	Hybridation	48
2.2.1.4	Analyse des données à l'aide d'outils bioinformatique de « Data mining ».....	49
2.2.2.	RESULTATS.....	49
2.2.2.1	Classification des 5 groupes de gènes (Clusters) les plus représentatifs.....	50
2.2.2.2	Classification des 3 fonctions biologiques les plus représentatives.....	50
2.2.2.3	Les 20 gènes les plus représentatifs : sur et sous exprimés dans les muscles atteints.....	51

3	<u>DISCUSSION</u>	<u>55</u>
3.1	DISCUSSION DE LA VALIDATION DE LA METHODE	55
3.1.1.	RESULTATS PRINCIPAUX ET EVALUATIONS DE CES RESULTATS	55
3.1.1.1	Utilisation de la puce ADN	55
3.1.1.2	Comparaison de deux muscles	55
3.1.2.	CONFRONTATION AVEC LA LITTERATURE ET PROJETS A VENIR	56
3.1.2.1	La puce ADN équine	56
3.1.2.2	La puce : un outil de diagnostic pour les affections musculaires ?	57
3.2	DISCUSSION DE L'UTILISATION DES PUCES ADN POUR ETUDIER LES TROUBLES FONCTIONNELS DES RHABDOMYOLYSES CHEZ LES CHEVAUX	57
3.2.1.	RESULTATS ET EVALUATION DES RESULTATS	57
3.2.2.	CONFRONTATION AVEC LA LITTERATURE	58
3.2.2.1	Troubles calciques à l'origine de rhabdomyolyse ?	59
3.2.2.2	Troubles mécaniques à l'origine de rhabdomyolyse ?	60
3.2.2.3	Gènes candidats responsables de rhabdomyolyse	60
	<u>CONCLUSION</u>	<u>61</u>
	<u>ANNEXES</u>	<u>63</u>
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>75</u>

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schéma de la structure du muscle	12
Figure 2 : Description de l'organisation structurale du muscle fessier moyen chez le cheval	14
Figure 3 : Glycolyse	16
Figure 4 : Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme	17
Figure 5 : Coupe histologique transversale de tissus musculaires colorés : coloration HE (coloration par l'hématéine et l'éosine)	24
Figure 6 : Sites de prélèvement du muscle fessier moyen	34
Figure 7 : Prélèvement à l'aide d'un pistolet automatique et obtention d'une « carotte » musculaire de 20 mg environ.	35
Figure 8 : Processus d'amplification avec le MessageAmp™ II aRNA kit.....	37
Figure 9 : Etapes d'hybridation des puces ADN.....	39
Figure 10 : Distribution de l'expression de l'ADNc du gluteus medius avec l'ADNc de souris universel en log ratio.....	43
Figure 11 : Nuage de points fluorescents d'ADNc de gluteus medius avec lui- même.	44
Figure 12 : Distribution des différents ratios d'expression génétique entre le gluteus medius et le longissimus dorsi.....	45
Figure 13 : Classification par catégorie fonctionnelle des gènes modulés dans le gluteus medius par rapport au longissimus dorsi.....	46
Tableau 1 : Classification et particularités des fibres musculaires selon les voies métaboliques, leurs substrats, la vascularisation et leur fonction : d'après Howald et Wasserman, 1988 (Barbe, 2004).....	13
Tableau 2 : Protocole des tests d'hybridation.	39
Tableau 3 : Résultats des analyses biochimiques réalisées sur les chevaux témoins et des atteints.....	48
Tableau 4 : Hybridations de comparaison.....	48
Tableau 5 : Classification par clusters des gènes significativement différents entre animaux malades et sains	50
Tableau 6 : Représentation des 3 biofonctions majoritaires	51

ABREVIATIONS

A	ADN :	Acide désoxyribonucléique
	ADNc :	ADN complémentaire
	ADNmt :	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
	ADP :	Adénosine diphosphate
	ARN :	Acide ribonucléique
	ARNase :	Enzyme qui dégrade l'ARN
	ARNm :	Acide ribonucléique messenger
	ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
	ARNt :	Acide ribonucléique transfert
	AST :	Aspartate aminotransférase
	ATP :	Adénosine 5'-triphosphate
	ATPase :	Enzyme qui hydrolyse l'ATP
C	CK :	Créatine kinase
D	DMSO :	Dimethyl sulfoxide
	DO :	Densité optique
E	ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ou dosage immunoenzymatique sur support solide
K	Kb :	Kilo bases
L	LDH :	Lacate déshydrogénase
M	MHC :	Complexe majeur d'histocompatibilité
N	NADH :	Nicotiamide adenine dinucléotide, forme réduite
	NCBI :	National Center Biotechnology Information
O	Oligo :	Oligonucléotide
P	Pb :	Paire de bases
	PCR :	Réaction en chaîne par polymérase
	PKA :	Protéine kinase A
	PSSM :	Myopathies de stockage des polysaccharides
R	RER	Rhabdomyolyse d'exercice récidivante
	RNG :	Réseau National des GENOPOLES
S	SDS-PAG	Electrophorèse de gel de polyacrylamide du sulfatedodécylque de sodium

LEXIQUE

Microsatellite : Un microsatellite ou séquence microsatellite est une séquence d'ADN formée par une répétition continue de motifs composés de 2 à 10 nucléotides. Cette séquence est également appelée simple sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), ou variable number tandem repeats (VNTR). Ces séquences microsatellites sont présentes sur l'ensemble du génome, le plus fréquemment au niveau des introns des gènes mais également au niveau d'exons.

Puce ADNc : Une puce à ADN (aussi appelée puce à gènes, biopuce ; et DNA chip, biochip, DNA-microarray ou microarray en anglais) est un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Cette biotechnologie récente permet de quantifier le niveau d'expression des gènes (transcrits) dans une cellule d'un tissu donné (foie, intestin...), à un moment donné (embryon, adulte...) et dans un état donné (malade, saine...).

Puce oligo-nucléotidique : Les puces de type « oligonucléotide » sont actuellement majoritaires sur le marché en raison de leur emploi plus simple. Les sondes sont des oligonucléotides de synthèse composés de 25 à 80 bases. Les séquences sont choisies afin d'obtenir une hybridation optimale avec le gène cible (intensité, sensibilité et spécificité), ce qui implique que la séquence de la cible soit connue

(http://www.medecine.flammarion.com/nl/21/pdf/Appareils_24Chap.pdf)

Transcriptome : le transcriptome est l'ensemble des ARN messager (molécules servant de matrice pour la synthèse des protéines) issu de l'expression d'une partie du génome d'un tissu cellulaire ou d'un type de cellule. La caractérisation et la quantification du transcriptome dans un tissu donné et dans des conditions données permet d'identifier les gènes actifs, de déterminer les mécanismes de régulation d'expression des gènes et de définir les réseaux d'expression des gènes. Une des techniques utilisées pour mesurer simultanément le niveau d'expression d'un grand nombre de types différents d'ARN messager est celle de la puce à ADN.

Sonde : C'est une séquence d'acide nucléique simple brin d'au moins 15 nucléotides et homologue d'une séquence ARN ou ADN

Il existe différents types de sondes :

- Sonde d'ADN génomique (sélectionnée à partir d'une banque d'ADN génomique)
- Sonde d'ADNc (sélectionnée à partir d'une banque de cDNA)
- Les oligosondes : 20-25 pb

- Les ribosondes

(http://www.med.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20061026025319cbendavico_urs_UE1_Claude_bendavid.pdf)

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

Avec environ 15 000 naissances de Trotteurs par an, la France est le pays d'élevage le plus important mais seulement un tiers des poulains présentent une bonne aptitude à l'effort. Ainsi, au fil des années, l'exigence des performances a accéléré la sélection génétique des chevaux. Les troubles musculaires acquis ou héréditaires, encore mal connus, représentent maintenant un problème majeur pour ces athlètes. Grâce aux nouvelles techniques de dépistage, une meilleure connaissance de l'étiologie permet un diagnostic plus précis (Nollet et Deprez, 2005).

Les caractéristiques du muscle en font un modèle de choix pour les études ARN/ADN (Hoffman *et al.*, 2003) :

- Les fibres musculaires sont constituées de fibres rapides et lentes ;
- La plasticité du muscle permet d'adapter remarquablement sa structure moléculaire aux besoins. Ainsi, l'hypertrophie ou l'atrophie musculaire sont des bons exemples de la régulation génétique. Le muscle s'adapte selon l'entraînement mais aussi très rapidement à l'inactivité. L'atrophie musculaire est un procédé actif dû à des gènes spécifiques (Cartegni *et al.*, 2006) ;
- Les pathologies musculaires sont variées et connues. Chez l'homme, les dystrophies musculaires peuvent être dues à une dizaine de mutations génétiques (Clarke et Guicheney, 2008) ;
- Dans certaines pathologies, la pharmacogénétique peut améliorer les performances musculaires.

L'analyse d'expression génétique avec des puces oligo-nucléotidiques est une nouvelle technique d'investigation utilisée en physiologie, physiopathologie et cancérologie (Chung *et al.*, 2002). En physiologie musculaire équine, les voies métaboliques d'exercice peuvent être explorées. Ainsi, les troubles métaboliques et structuraux tels que les rhabdomyolyses à l'effort (RER) (Mlekoday *et al.*, 2001 ; Valberg *et al.*, 1999) et les myopathies de stockage à polysaccharides (PSSM) seront mieux connus (Firshman *et al.*, 2003 ; Quiroz-Rothe *et al.*, 2002 ; Valberg, 1999). La prédisposition génétique des RER et des PSSM a été étudiée dans différentes races de chevaux (Dranchak *et al.*, 2005 ; MacLeay *et al.*, 1999b ; Valberg *et al.*, 1996). Une corrélation entre des gènes allèles « candidats » et des symptômes cliniques a été montrée (Park *et al.*, 2003 ; Ward *et al.*, 2004). L'analyse d'expression génétique est une nouvelle méthode d'exploration du métabolisme : l'expression des gènes modifie la fonction musculaire. Seulement 3 puces à ADN ont récemment été décrites (Mc Leod, 2005 ; Vandenplas *et al.*, 2005) et ont permis d'identifier 18 924 transcrits de gènes équins provenant de liquide synovial équin dont seulement 3 098 sont annotés sur des puces. Ces puces à ADN équines ont été obtenues à l'aide de transcriptomes et de données séquentielles, mais peu de ces gènes sont annotés et extraits de tissus non musculaires. Des puces à ADN souris 15K (Institut

National de l'Age) pourraient être utilisées pour une analyse plus globale du génome (Kargul *et al.*, 2001). Ces puces représentent 15 264 gènes dont environ 11 000 sont annotés. L'hybridation interspécifique entre l'ADN équin et des fragments de 15 000 nucléotides de souris est possible. Effectivement, les gènes du métabolisme de base ont été bien conservés lors de l'évolution génétique des mammifères. Plus de 85% d'homologies ont été observées entre les gènes de souris et des humains. Par exemple, les gènes de la chaîne lourde de myosine sont presque identiques entre l'homme et la souris (Weiss *et al.*, 1999). Ainsi, des puces ADN d'une espèce génétiquement homologue au cheval pourraient être utilisées pour l'étude de la relation gène/maladie même en l'absence d'hérédité.

Nous avons donc décidé de tester des puces à ADN souris pour étudier des muscles équins. L'utilisation des puces permettrait de mieux comprendre les adaptations et les troubles métaboliques des muscles équins après exercice. Le but de cette étude était de :

1. tester des puces à ADN souris pour analyser le profil d'expression génique des muscles sains équins,
2. utiliser ces puces pour explorer les gènes impliqués lors de rhabdomyolyses à l'effort chez les chevaux Trotteur Français atteints.



1 Travail Bibliographique : Etude génétique des rhabdomyolyses

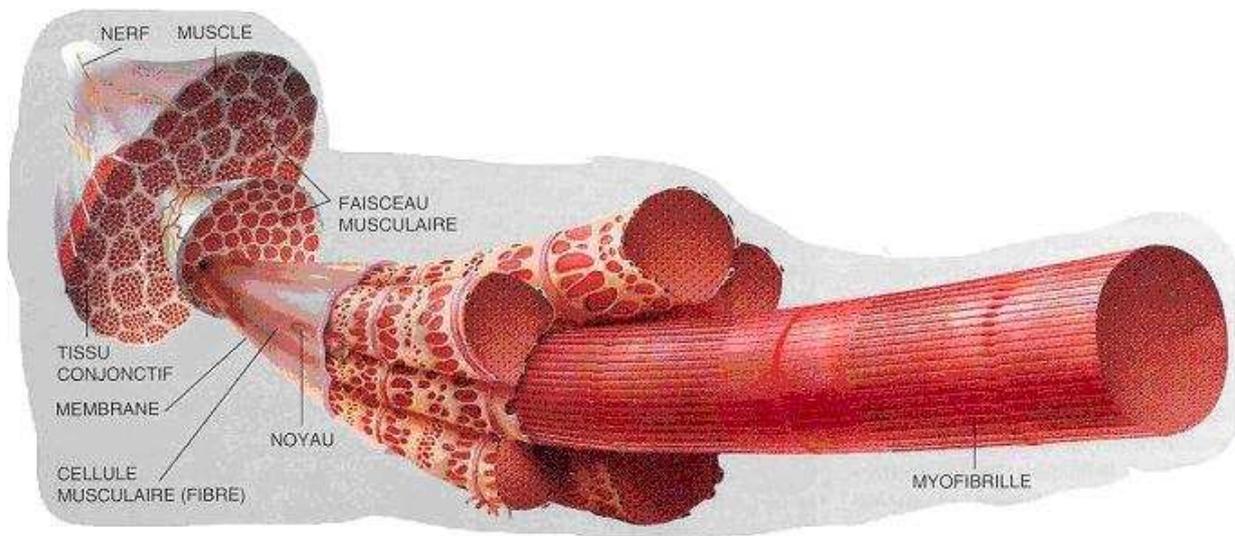
1.1 Rappels physiologiques

1.1.1. Typologie musculaire

Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires striées. La cellule musculaire encore appelée fibre musculaire ou myocyte est l'unité du tissu musculaire. Il s'agit d'une cellule géante, plurinucléée suite à la fusion de plusieurs myoblastes mononuclés. Sa forme est cylindrique d'un diamètre compris entre 10 et 100 μm et pouvant atteindre une longueur de plusieurs cm (figure 1). Le sarcolemme comprenant la membrane basale et la membrane plasmique enveloppe ces fibres. Entre ces deux membranes, se logent des cellules satellites qui permettent la régénération du muscle lésé et la croissance du muscle (Cotrel, 2004).

Chaque fibre musculaire contient un réseau de myofibrilles, elles-mêmes composées de sarcomères. Chaque sarcomère est constitué de filaments d'actine et de myofilaments de myosine qui par chevauchements permettent les contractions musculaires. Il s'agit d'une conversion d'énergie chimique, avec la formation de liaisons entre les deux molécules, en énergie mécanique grâce à une activité ATPasique. La contraction musculaire naît d'un potentiel d'action qui permet la libération des ions calcium par le réticulum sarcoplasmique. Le calcium déclenche l'interaction entre les filaments. Le changement de position de la myosine déclenche l'activité ATPasique. La relaxation est possible grâce aux pompes du réticulum qui recaptent le calcium (Barbe, 2004 ; Rivero *et al.*, 1996).

Figure 1 : Schéma de la structure du muscle (Cotrel, 2004)



Il existe trois types de fibres musculaires chez le cheval (tableau 1) (Rivero *et al.*, 1996) :

- MHC-I : métabolisme oxydatif
- MHC-IIA : métabolisme oxydatif et glycolytique
- MHC-IIX : métabolisme glycolytique avec une importante vitesse de contraction

Tableau 1 : Classification et particularités des fibres musculaires selon les voies métaboliques, leurs substrats, la vascularisation et leur fonction : d'après Howald et Wasserman, 1988 (Barbe, 2004)

Type de fibres	I	Ila	Ilb (ou IIX)
Voies métaboliques G=glycolytique, O=oxydative	G+ O+++	G++ O++	G+++ O+
Substrats G=glucose, AG=acides gras	G+ AG++	G++ AG+	G++ AG+
Vascularisation	+++	++	+
Vitesse et force de contraction	+	++	+++
Résistance à la fatigue	+++	++	+
Commentaires	Voie aérobie, endurance	Intermédiaire	Puissance mais très rapidement fatigable (sprinter)

Il existe différentes méthodes de typage :

- Histoenzymatique (Lindholm et Piehl, 1974 ; Snow et Guy, 1980) qui est à l'origine de la classification des fibres ;
- Electrophorétique qui permet une classification en fonction du poids et de la charge moléculaire ;
- Immunologique : par marquage d'anticorps, anti-myosine par exemple.

Une comparaison de ces différents typages (Rivero *et al.*, 1999) montre la différence entre les méthodes histochimiques ou immunohistochimiques, électrophorétiques et ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay : dosage d'immunosorption liée à l'enzyme, technique d'examen recourant à des enzymes comme marqueur).

Une étude sur 100 chevaux anglo-arabes a déterminé le pourcentage d'héritabilité des fibres rapides de myosine (MHC2) et analysé les relations entre les phénotypes et les performances sportives. Des biopsies musculaires du fessier moyen et du biceps fémoral ont été faites puis analysées par ELISA. L'héritabilité a été estimée seulement à 13% en rapport peut être à la grande homogénéité des traits musculaires sur ces chevaux déjà très sélectionnés. Enfin, la force musculaire est liée à la présence de MHC2 (Barrey *et al.*, 1999).

Des échantillons musculaires prélevés par biopsie ont permis l'étude de la MHC sur le muscle fessier moyen du cheval. La méthode ELISA a identifié trois types de fibres : MHC I, MHC IIX, MHC IIA. Cette classification a été confirmée par différentes méthodes SDS-PAGE (électrophorèse de gel de polyacrylamide du sulfatedodécylque de sodium), immunoblot, histochimie et immunocytologie. Il a été ainsi démontré que les fibres MHC IIB ne sont pas exprimées chez le cheval (Rivero *et al.*, 1999).

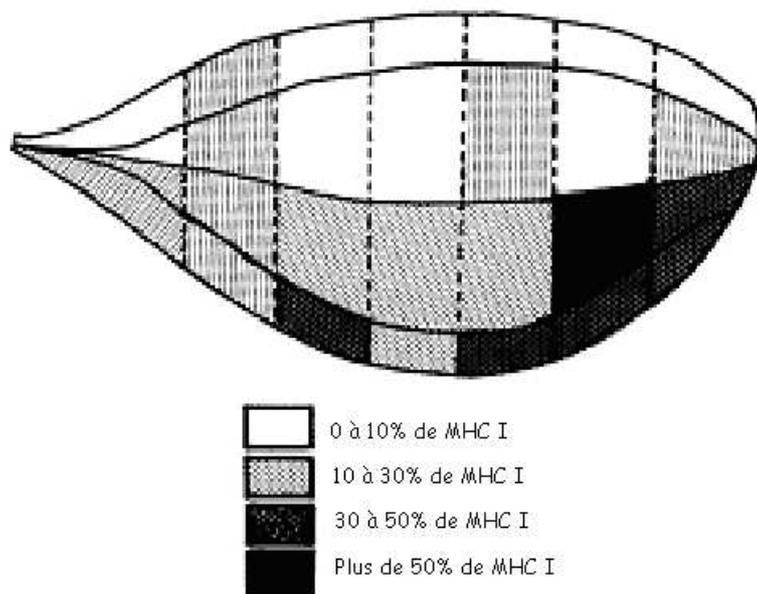
Sur 68 chevaux trotteurs âgés de 6 mois à 8 ans, les fibres biopsées ont été classées en 3 catégories : les fibres lentes (24%), les fibres rapides et hautement oxydatives (54%) qui augmentent avec l'âge et les fibres rapides (22%). La répartition de ces fibres selon les muscles reste relativement invariable avec l'âge (Lindholm et Piehl, 1974).

La concentration musculaire en glycogène est plus élevée chez les adultes contrairement au pyruvate. SDH (succino-déshydrogénase) et PFK (phosphofructokinase) augmentent avec l'activité.

La distribution des fibres musculaires type I ou II a été étudiée sur 9 régions musculaires différentes du fessier moyen et de larges variations ont été observées (Van den Hoven *et al.*, 1985).

Le pourcentage de fibre I augmente avec la profondeur et la crânalité du muscle. Les parties profondes du muscle ont un caractère plus aérobie en corrélation avec leur fonction (figure 2). En effet, les régions superficielles sont adaptées à la fonction de propulsion. Ainsi, les analyses doivent être interprétées selon le site de biopsie.

Figure 2 : Description de l'organisation structurale du muscle fessier moyen chez le cheval (Cotrel, 2004)



Chez l'homme, après des biopsies sur le muscle vaste latéral obtenues avant et après exercice, une augmentation significative des ARNm des MCH de type I, IIa et IIx a été montrée. De plus, les ARNm de Myo-D et myogénine augmentent mais ceux de Id-1 ne varient pas car ce sont des facteurs de régulation. De plus, la Myo-D est corrélée avec les fibres de type IIx et la myogénine avec les fibres de type I et IIa (Willoughby *et al.*, 2008).

1.1.2. Métabolisme

Afin de mieux percevoir les liens unissant l'excès de glycogène musculaire et la rhabdomyolyse d'effort récidivante, une revue des voies métaboliques énergétiques est nécessaire (Barbe, 2004).

1.1.2.1 La voie aérobie avec la glycolyse et le cycle de Krebs

La glycolyse par transformation d'un glucose en 2 acides pyruviques permet la formation de 8 molécules d'ATP. Le cycle de Krebs grâce à la formation d'un groupement acétyl activé permet le gain de 24 molécules d'ATP à partir de 2 acides pyruviques (figure 3).

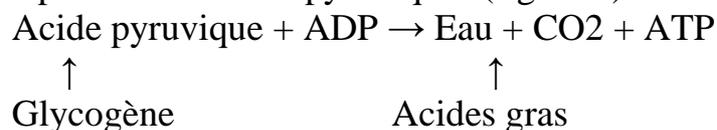
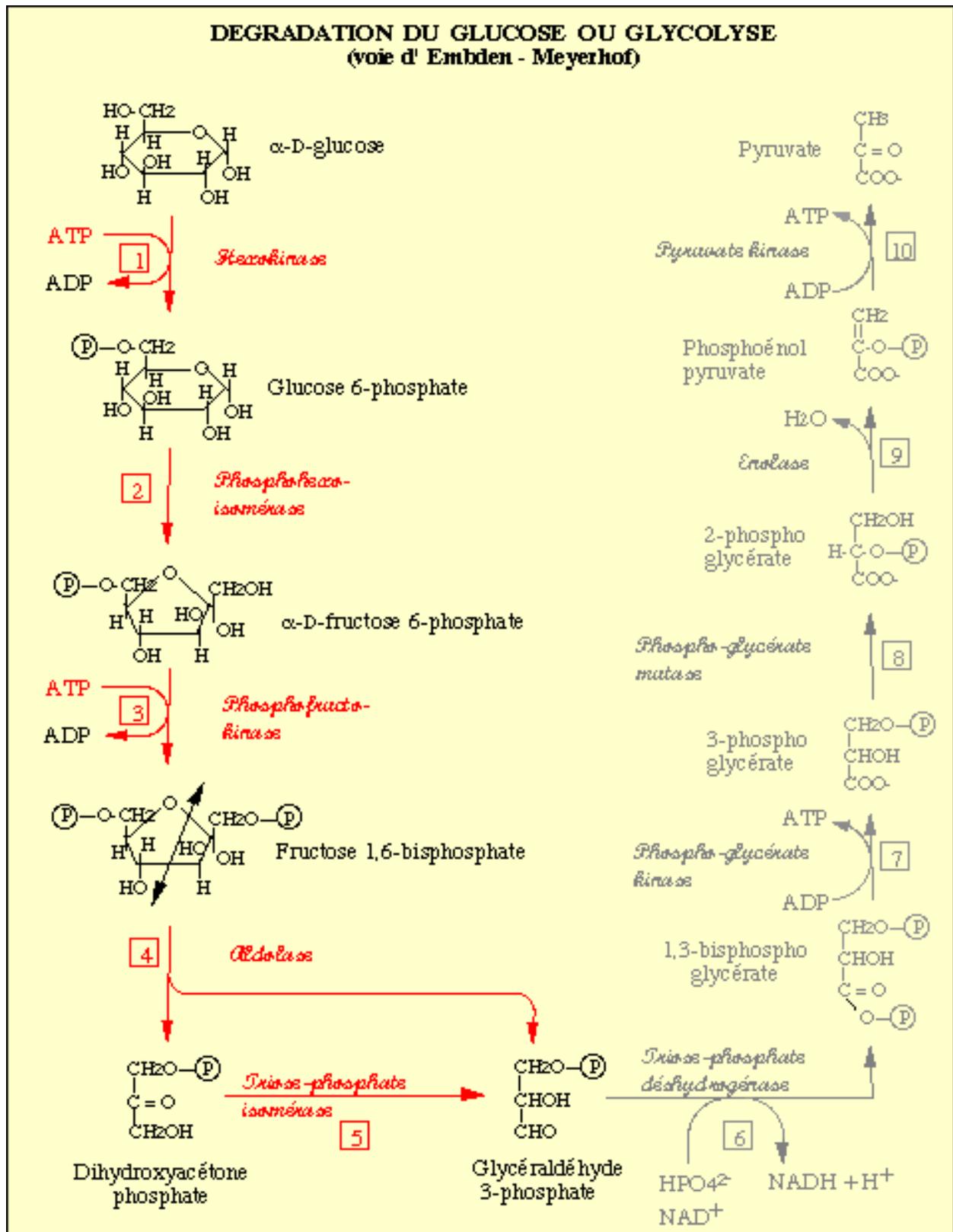
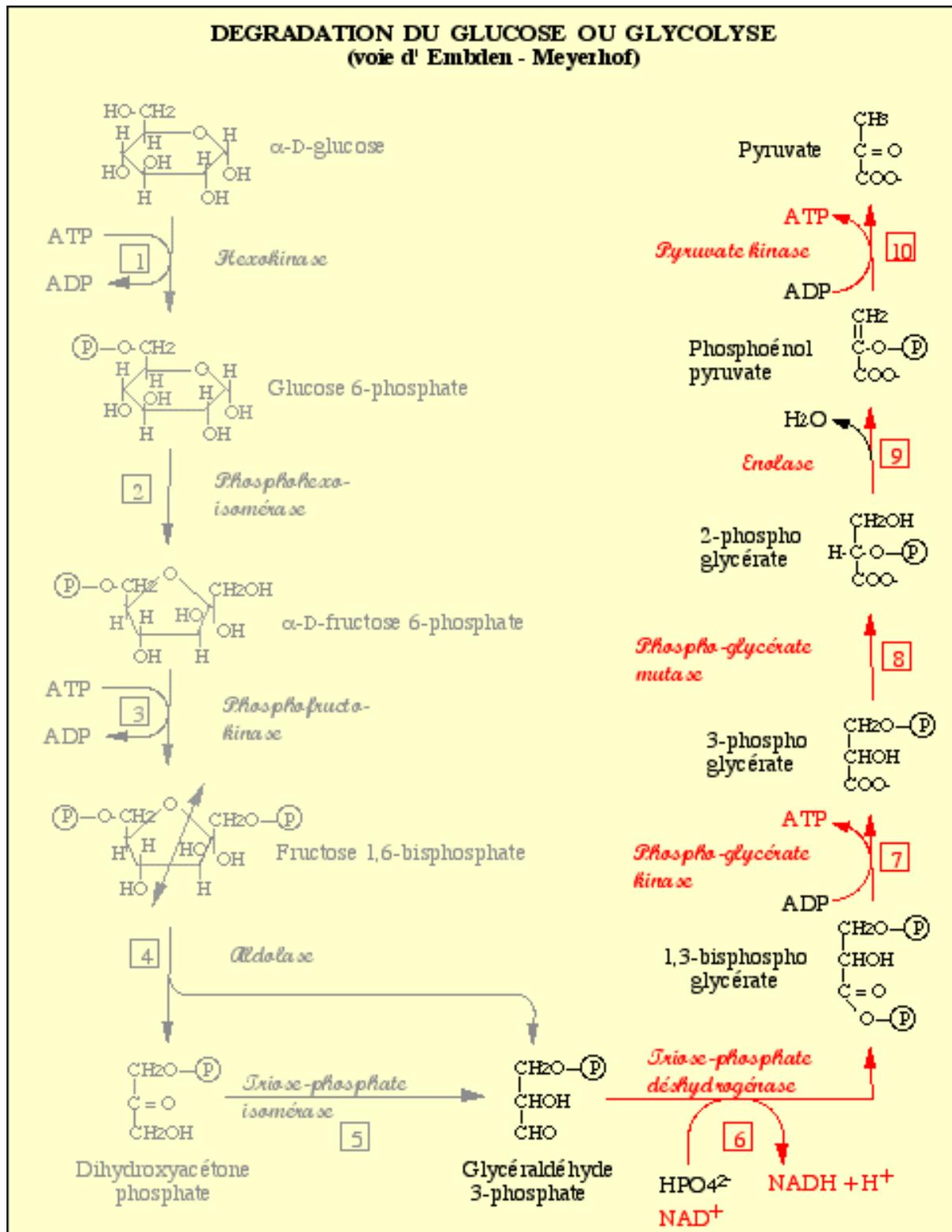


Figure 3 : Glycolyse (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Metabo/glyco1.html#>)

Phase préparatoire : phosphorylation du glucose et sa conversion en glyceraldéhyde-3-phosphate

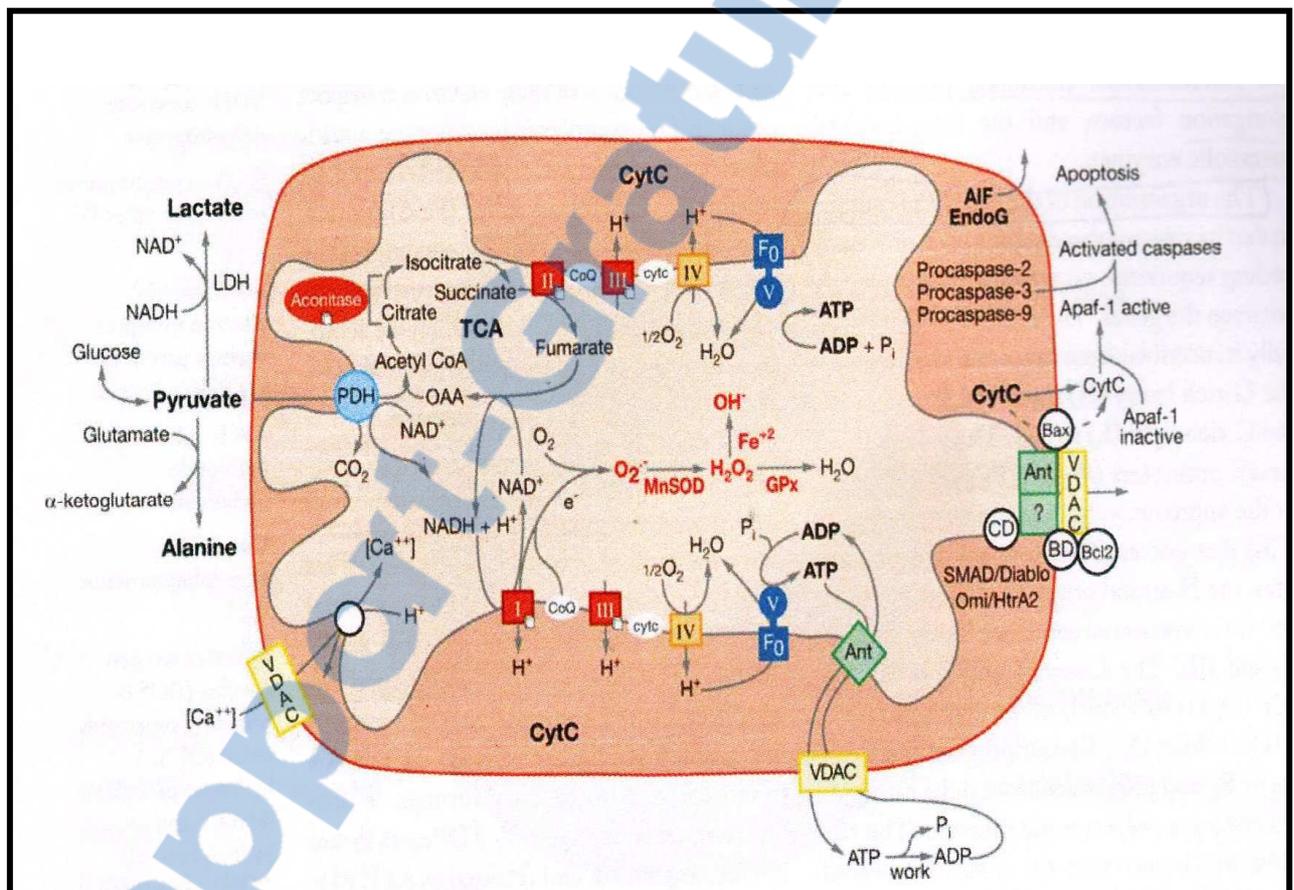


Phase de remboursement : Transformation du glyceraldéhyde-3-phosphate en pyruvate et formation couplée d'ATP



La mitochondrie est un organe spécialisé dans l'apport d'énergie cellulaire grâce à la phosphorylation oxydative. Ainsi, elle est communément appelée « la centrale énergétique » ou encore « carrefour métabolique », car s'y trouvent les étapes primordiales du cycle respiratoire aérobie (cycle de Krebs, chaîne respiratoire de transport d'électrons) qui convertissent l'énergie des molécules organiques issues de la dégradation du glucose en énergie directement utilisable par la cellule sous forme d'ATP (figure 4).

Figure 4 : Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme
http://www.mitomap.org/MITOMAP/mito_apop.pdf



- déficit en phosphoglycerate mutase avec présence d'agrégats tubulaires ;
- déficit en lactate déshydrogénase, non liée à la glycolyse.

Les myopathies liées à un défaut de stockage de polysaccharides (PSSM) sont caractérisées par une accumulation de glycogène dans les muscles. L'origine reste encore mal déterminée. Il existe plusieurs hypothèses :

- Anomalie dans le métabolisme ;
- Excès de production du glycogène ;
- Maladies de stockage de polysaccharides peuvent être héréditaires chez l'homme et le cheval ;
- Défaut de régulation du calcium avec l'exemple de l'hyperthermie maligne ;
- Myopathies mitochondriales par déficience de la chaîne respiratoire, par anomalie du transport des substrats et de la β oxydation des acides gras libres ;
- Relation entre un hypothyroïdisme secondaire et une certaine forme de myopathie ;
- Incidence des rhabdomyolyses est plus forte chez les femelles mais sans trouver de corrélation avec le cycle oestral.

L'héritabilité des PSSM, une glycogénose, et de l'intolérance à l'effort a été étudiée dans différentes races équinnes. Les chevaux ont été sélectionnés selon leurs antécédents de PSSM ou d'intolérance à l'effort, et classés en fonction de l'augmentation de la concentration sérique en CK et la caractérisation histochimique par biopsie musculaire. Ainsi le caractère génétique autosomal récessif des PSSM a été montré chez les Quarter-Horse (Valberg *et al.*, 1996).

1.1.3.2 L'hyperthermie maligne

Après 3 heures et 15 minutes d'anesthésie à l'halothane et injection de succinylcholine, une hyperthermie maligne a été observée sur un Anglo-arabe de 4 ans. Hyperkaliémie, hyperphosphatémie, myoglobulinurie avec une augmentation des CPK et de l'ornithine-carbonyl transférase ont pu être mis en évidence. De plus, une contraction musculaire exagérée a été montrée par biopsie musculaire.

De nombreuses études ont prouvé l'existence d'une hérédité familiale chez l'homme et raciale chez le porc ; chez les chevaux, il n'existe que des cas isolés (Waldron-Mease *et al.*, 1981).

Cette hyperthermie est due au relargage excessif de calcium par le réticulum sarcoplasmique avec une déficience du couplage excitation/contraction. Le traitement comprend l'injection de Dantrolène qui permet de diminuer le relargage de calcium.

1.1.3.3 La myopathie atypique

Il existe une myopathie atypique d'origine encore inconnue qui touche toutes les races de chevaux (Votion et Serteyn, 2008). Plusieurs étiologies ont été proposées mais à ce jour seuls les traitements symptomatiques sont utilisés : vidange régulière de la vessie, administration d'anti-inflammatoires, de DMSO, hydratation et restauration de la volémie, ...

Cette maladie est également appelée *myoglobinurie atypique des chevaux au pré*. Son origine est encore inconnue et probablement due à l'ingestion ou à la production de toxines (mycotoxines, phycotoxines ou bactériennes).

Les cas de maladie sont souvent observés à l'automne et au printemps, probablement en rapport avec la fraîcheur et l'humidité.

L'étiologie étant incertaine, aucune prophylaxie n'est possible. Néanmoins, il est recommandé de mettre les chevaux dans des prairies suffisamment fournies en automne, de retirer les amas de feuilles mortes, d'empêcher l'accès des animaux aux zones humides lors des périodes à risque.

Les symptômes apparaissent de manière soudaine : faiblesse musculaire (animaux couchés sur le flanc), difficulté pour se lever, se tenir debout et se déplacer, urines foncées, raideur musculaire, muqueuse buccale rouge, tremblements musculaires, tachycardie, difficultés respiratoires, sudation mais aussi parfois : signes de coliques, d'hypothermie ($< 36^{\circ}\text{C}$). Le cheval est déprimé mais continue néanmoins à vouloir manger. La mortalité est élevée (90 %) ; les chevaux sont parfois retrouvés morts au pré, ou doivent être euthanasiés en raison de la gravité des symptômes. Il existe une augmentation importante des valeurs de créatinine kinase (CK), aspartate aminotransférase (AST) et lactate déshydrogénase (LDH), et une diminution de la pression artérielle d'oxygène et du calcium ionisé. La biopsie musculaire des muscles posturaux et respiratoires montre une dégénérescence multifocale (http://www.favv-afsc.fgov.be/sp/sa-my-atypique/my-atypique_fr.asp).

1.1.3.4 La rhabdomyolyse d'exercice asymptomatique

Chez des coureurs longues distances, après une course continue de 246 km (Skenderi *et al.*, 2006), les valeurs du bilan hépatique et des enzymes musculaires étaient considérablement augmentées mais aucun symptôme sévère n'a nécessité une hospitalisation. Après un effort modéré, une rhabdomyolyse asymptomatique d'exercice peut ainsi apparaître.

Une étude a comparé les désordres métaboliques entre plusieurs chevaux d'endurance en compétition (Barrey *et al.*, 2006). Après des prises de sang pendant la course, les troubles métaboliques ont pu être comparés. Dix chevaux ont pu continuer la course mais 10 chevaux ont été disqualifiés pour troubles

métaboliques. Une différence significative a été observée uniquement pour les monocytes, ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine), HCO₃⁻ et Mg. Les enzymes musculaires telles que CK et AST n'étaient pas significativement différents entre les 2 groupes. Les signes de rhabdomyolyse ne sont donc pas directement liés aux modifications des enzymes musculaires.

1.1.3.5 La paralysie hyperkaliémique périodique

Observée chez le Quarter Horse, la paralysie hyperkaliémique est d'origine génétique, liée à une mutation de la sous-unité alpha du canal sodium des cellules musculaires. Faiblesse musculaire avec fasciculations, spasmes musculaires ou paralysie sont retrouvés (Kenneth W.Hinchcliff *et al.*, 2004).

1.1.3.6 La myotonie

La myotonie équine est très rare et a priori d'origine génétique avec une implication du canal chlore du sarcolemne (Kenneth W.Hinchcliff *et al.*, 2004). Des contractions musculaires sont observées dès le plus jeune âge. Une carrière sportive est impossible mais le pronostic vital est excellent.

1.1.3.7 La dystrophie myotonique

Tout comme la myotonie, la dystrophie myotonique est rare et probablement d'origine génétique (Kenneth W.Hinchcliff *et al.*, 2004). En plus de la myotonie, des contractures tendineuses et une atrophie testiculaire sont observées. Les traitements sont décevants, la morbidité est fréquente et aboutit à l'euthanasie.

1.1.3.8 La myopathie mitochondriale

Il s'agit d'une intolérance accrue à l'effort provoquée par une absence de production d'ATP par la mitochondrie. Une acidose lactique liée à l'arrêt de la dégradation du glucose au stade d'acide lactique est la conséquence de la baisse de l'activité de phosphorylation oxydative des mitochondries. L'hypothèse d'une mutation de l'ADN mitochondrial est envisagée (Kenneth W.Hinchcliff *et al.*, 2004). Il n'y a pas de traitement et le pronostic est mauvais.

1.1.3.9 La myopathie fibreuse

La myopathie fibreuse se déclare par une boiterie postérieure particulière où le pied vient frapper violemment le sol à la fin de la phase antérieure. La boiterie peut faire suite à un traumatisme mais il existe des formes congénitales. Une masse fibreuse peut être palpable au niveau du muscle semi-tendineux. La section de cette masse fibreuse ou une ténectomie de l'insertion tibiale du semi-tendineux peuvent améliorer la boiterie.

1.2 Rhabdomyolyses à l'effort

1.2.1. Epidémiologie et diagnostic

Selon Snow et Valberg, le terme rhabdomyolyse dans le sens de « dissolution des fibres musculaires » regroupe ainsi les différentes affections musculaires (Art *et al.*, 2000). Cliniquement, les rhabdomyolyses sont aiguës (83%) ou chroniques (17%) et dans ce dernier cas le plus fréquemment récurrentes. Leur prévalence est environ de 10% chez les Pura-Sangs (Aleman, 2008).

Les facteurs de risques des rhabdomyolyses récurrentes sont encore très mal connus :

- Jeune âge,
- Femelle,
- Fort développement musculaire,
- Surpoids,
- Caractère stressé de l'animal.

L'étiologie est multifactorielle. Contrairement au type aigu, les rhabdomyolyses récurrentes sont indépendantes de l'intensité de l'effort. Le facteur déclenchant est l'effort accompagné, de façon non systématique, d'un stress, d'un entraînement et/ou d'une ration alimentaire peu adaptés. Les facteurs étiologiques les plus importants sont :

- une surcharge glycogénique avec une accumulation de glycogène intramusculaire et des rations alimentaires riches en hydrates de carbone (MacLeay *et al.*, 1999a) ;
- une déficience de la fonction de sarcolemme dans les hyperthermies malignes (Beech *et al.*, 1993) ;
- un déséquilibre ionique (Beech, 1997 ; Freestone *et al.*, 1991) ;
- une carence en vitamine E et sélénium (Roneus et Hakkarainen, 1985) ;

- une influence hormonale, l'incidence étant plus élevée chez les femelles (Harris, 1991) ;
- des causes infectieuses avec, par exemple, une reprise du travail trop rapide suite à une infection à *herpesvirus* de type I (rhinopneumonie) (Harris, 1990) ;
- une accumulation intramusculaire anormale de polysaccharides chez, entre autres, le cheval de trait belge et le quarter horse (Valberg *et al.*, 1992) ;
- des facteurs génétiques en cours d'étude (Collinder *et al.*, 1997).

La principale cause de rhabdomyolyse d'effort est la RER (Myopathie d'effort récidivante).

Les RER sont dues à un dysfonctionnement de la régulation du calcium intracellulaire. Une étude sur 1000 chevaux de course a montré une prévalence des RER de 5% (www.cvm.umn.edu/umec/lab/RER_new.html). Une hérédité avec une augmentation significative de la prévalence dans certaines lignées est possible. Cependant, les facteurs de stress modifient très fortement cette prévalence.

Même si les RER sont souvent liées au sexe, au tempérament et à l'alimentation, des résultats *in vitro* par tests de contractures musculaires ont démontré un modèle héréditaire avec un caractère dominant autosomal (Dranchak *et al.*, 2005).

De même, une étude sur 4 familles d'Anglo-Arabs a été faite pour déterminer l'hérédité des RER (MacLeay *et al.*, 1999b). Ainsi, après confirmation de RER par analyse biochimique, l'étude généalogique a montré le caractère héréditaire autosomal dominant avec des variabilités d'expression.

1.2.2. Physiopathologie

La rhabdomyolyse à l'exercice est une lyse brutale des fibres musculaires squelettiques. Elle peut être sporadique ou récidivante. La forme récidivante peut se produire à tout moment de l'exercice. Le risque de récurrence est très aléatoire, « les chevaux ont un terrain favorable ».

Lors d'exercice, il existe des épisodes subcliniques de nécrose musculaire avec une augmentation des concentrations plasmatiques en AST, CK et myoglobine (Valberg *et al.*, 1993). Cependant, lors de RER, l'augmentation de ces enzymes est présente au repos et serait due à des augmentations récurrentes des enzymes plus qu'à une perméabilité anormale du sarcolemme.

Les résultats des biopsies et prises de sang effectuées sur des chevaux RER présentant des symptômes (RERa) après un exercice ou non (RERb) et des témoins ont été comparés (Valberg *et al.*, 1993). Les RERa après exercice présentent une augmentation des concentrations de cortisol et de glucose dans le

sang. Cependant, les paramètres biochimiques et les métaboliques musculaires n'étaient pas significativement différents par rapport aux RERb et aux témoins. Au repos, RERa et RERb présentent une augmentation du glycogène dans les muscles.

1.2.3. Diagnostic clinique et traitement

Il n'y a pas de diagnostic spécifique. Les commémoratifs et l'anamnèse sont relevés (Barbe, 2004). L'intensité des signes cliniques des rhabdomyolyses est extrêmement variable. Elle peut aller de l'absence de signes jusqu'à la mort de l'animal avec douleurs importantes. Un examen clinique complet est réalisé puis des examens complémentaires. Dans le sang, la mesure de la concentration des enzymes musculaires : CK, AST, LDH et l'anhydrase carbonique (CA III) est recommandée. Il est possible de réaliser des tests de tolérance à l'effort avec des mesures répétées des enzymes. Dans le cas de rhabdomyolyses, des nucléi sont en position centrale dans les biopsies musculaires (figure 5). La concentration de myoglobine dans le sang ou les urines peut aussi être mesurée. La scintigraphie et l'électromyographie sont d'autres outils de diagnostic mais plus rarement utilisés.

Figure 5 : Coupe histologique transversale de tissus musculaires colorés : coloration HE (coloration par l'hématéine et l'éosine) (Landry, 2005)

Photo 1 : Cellules musculaires normales

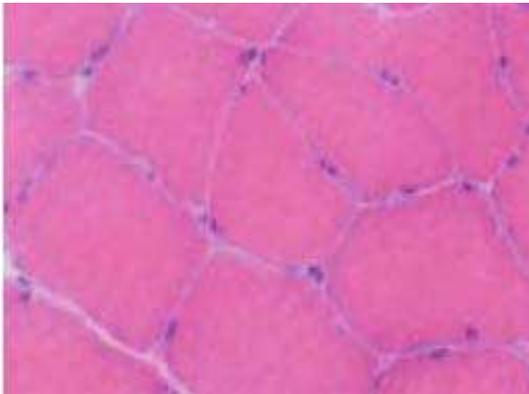
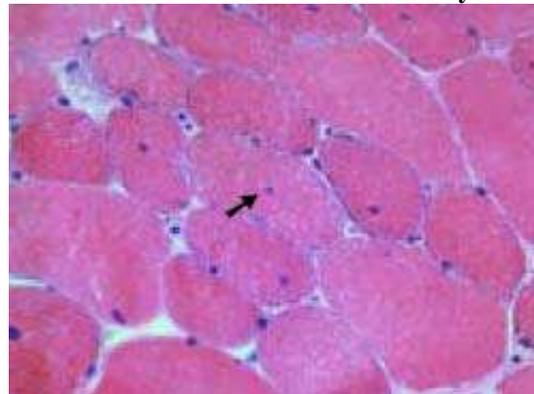


Photo 2 : Cellules musculaires rhabdomyolisées



Les biopsies du longissimus et du fessier moyen réalisées sur 5 chevaux d'obstacles et 4 chevaux de dressage présentant des douleurs dorsales et suspects de PSSM ont été comparées avec celles obtenues chez 6 chevaux RER et 6 témoins (Quiroz-Rothe *et al.*, 2002). Les biopsies du muscle longissimus présentaient des signes pathognomoniques de PSSM avec une accumulation de glycogène et/ou un dépôt polysaccharidique anormal. Les résultats de biopsies du longissimus des chevaux présentant des douleurs dorsales étaient similaires

aux biopsies du fessier faites sur les RER. Cette étude montre donc qu'il est possible d'utiliser les biopsies du longissimus comme outil de diagnostic lors de douleurs dorsales chez les chevaux.

La myopathie d'exercice est connue chez les chevaux depuis plus de 100 ans sous des dénominations diverses telles que *azoturie*, *tying-up* et *maladie du lundi*. Rhabdomyolyse associée à l'effort semble un terme plus approprié (Art *et al.*, 2000). Ces rhabdomyolyses s'observent chez des chevaux de toutes races et toutes les disciplines sportives. En dépit de signes cliniques similaires, elles sont le dénominateur commun de plusieurs entités fondamentalement différentes quant à leur pathogénie (Valberg *et al.*, 1999).

Le diagnostic clinique est confirmé par une augmentation des valeurs sériques des enzymes musculaires et particulièrement des CK (Beech, 1997).

Les myopathies d'exercice comprennent trois entités : la rhabdomyolyse sporadique, la rhabdomyolyse récurrente (ou récidivante) et la myopathie d'épuisement.

La rhabdomyolyse d'exercice sporadique est une maladie aiguë qui atteint les chevaux de façon sporadique pendant ou après un exercice violent, excessif ou inadapté.

La rhabdomyolyse d'exercice récidivante est une maladie qui se traduit par des épisodes récurrents de myopathie chez des chevaux génétiquement sensibles suite à un dysfonctionnement sous-jacent de la cellule musculaire. Contrairement à la forme sporadique précitée, les épisodes de rhabdomyolyse sont souvent liés à une surexcitation du cheval plutôt qu'à un exercice excessif, l'intensité de l'exercice qui déclenche les symptômes étant souvent très faible. Les crises sont récurrentes mais le délai entre les crises est très variable. C'est la myopathie la plus fréquente chez les pur-sang de course. Elle se caractérise cliniquement par des douleurs musculaires après l'exercice et d'un point de vue biochimique par une augmentation des CK sériques. La prévention du stress et un exercice quotidien semblent diminuer les crises chez les chevaux prédisposés. La mutation causale n'a pas été identifiée à ce jour, mais son mode de transmission est clairement autosomal dominant (Dranchak *et al.*, 1999b). Il existe un test fonctionnel fiable pour dépister ou confirmer les chevaux génétiquement prédisposés. Ce test, *in vitro* sur base d'une biopsie, fait appel à une provocation à la caféine, à l'halothane ou au potassium (Dranchak *et al.*, 2005). La sensibilité des cellules musculaires à ces substances pour induire une contraction est augmentée chez les chevaux concernés par rapport aux chevaux sains. Toutes ces données rappellent l'hyperthermie maligne du porc. Néanmoins, il ne s'agirait pas de la même mutation ; le récepteur de la ryanodine du canal à calcium du réticulum sarcoplasmique est intact et fonctionnel chez le cheval (Lentz *et al.*, 1999 ; Ward *et al.*, 2000). Il est intéressant de retenir que beaucoup de pur-sang présentant cette rhabdomyolyse récidivante ont aussi développé des myopathies post-anesthésiques.

Le traitement est curatif et préventif dans le cas des rhabdomyolyses récurrentes. Il faut calmer la douleur, prévenir les complications musculaires, psychologiques, ioniques et rénales et modifier la gestion du cheval selon l'étiologie. Le traitement est principalement antalgique avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens par voie veineuse de préférence après rétablissement de la volémie. De plus, le contrôle de l'anxiété peut aussi se faire à l'aide de sédatifs. Enfin, une réhydratation avec une correction de l'équilibre électrolytique est parfois indispensable.

1.3 La carte génétique chez le cheval

1.3.1. Le séquençage du génome du cheval

Le récent développement de la carte génétique du cheval et le séquençage complet du génome équin ont permis d'accélérer les découvertes génétiques. En effet, la carte du génome du cheval a considérablement augmenté depuis ces 6 dernières années (Chowdhary et Raudsepp, 2008). En 2001, 300 marqueurs sur 31 paires de chromosomes et le chromosome X ont été identifiés. En 2003, la carte génétique équine comptait seulement 109 gènes autosomiques dont 2 sur le chromosome X et 15 gènes mitochondriaux (Rankinen *et al.*, 2004). De nos jours, la carte génétique équine est une des plus référencées avec approximativement 4350 marqueurs sur une séquence d'environ 2.68 Gbp de long. De nouvelles techniques avec les puces spécifiquement équines ont été développées.

1.3.2. Les gènes candidats identifiés dans d'autres espèces

Chez l'homme, de nombreuses maladies génétiques entraînent un retard de croissance ou des maladies musculaires (Barbe, 2004). La myopathie de Duchenne, par exemple, est liée à une mutation sur le gène d'une protéine kinase musculaire du chromosome X. La cellule musculaire devient alors perméable à certaines molécules, la pression cytoplasmique devient trop élevée et entraîne la mort cellulaire.

1.3.2.1 Le gène du récepteur à la ryanodine du muscle squelettique

L'hyperthermie maligne est due à une hypersensibilité du pont de relargage de calcium. L'ouverture du pont est facilitée et sa fermeture est inhibée (Fujii *et al.*, 1991).

Le gène du récepteur à la ryanodine du muscle squelettique (*ryr1*) a été localisé sur le chromosome 19 q13-1 de l'homme et sur le chromosome 6 p11-q21 du porc.

Chez le cheval, la *myopathie post-anesthésique généralisée*, également dénommée *hyperthermie maligne*, se caractérise par une hyperthermie et une acidose associées à une nécrose musculaire localisée, plus particulièrement aux membres postérieurs suite à une anesthésie à l'halothane. Le pronostic est réservé. Les perturbations systémiques seraient dues au stress de l'anesthésie et à la sensibilité des cellules musculaires aux agents anesthésiques (l'halothane) ou relaxants (succinylcholine). Sur un plan physiopathologique et par analogie avec le porc et l'homme, la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique induit des contractures musculaires en provoquant une hyperthermie (Valberg et Hodgson, 2002). D'autre part, chez les chevaux, il existerait une association entre la myopathie d'exercice, la myopathie post-anesthésique et l'hyperthermie maligne. Cette association a été confirmée par le test fonctionnel à la caféine sur un muscle prélevé: les fibres musculaires pathologiques se contractent à des concentrations plus faibles de caféine (Manley *et al.*, 1983).

1.3.2.2 Le gène CPT II

En humaine, la déficience du gène CPT II a été mise en évidence dans une maladie autosomale récessive avec des rhabdomyolyses (Vladutiu *et al.*, 2000).

1.3.2.3 Le gène de la myosine MHC IIa

Chez l'homme, une myopathie avec une hérédité autosomale dominante ayant une mutation sur le gène de la myosine MHC IIa a été décrite. Une faiblesse musculaire et même une dégénérescence des muscles ont été observées. Les signes cliniques sont mineurs chez les jeunes et s'amplifient avec l'âge (Tajsharghi *et al.*, 2002).

1.3.2.4 Le gène CPT2

La déficience de l'enzyme palmitoyltransférase carnitine II est une maladie autosomale récessive avec douleur musculaire et rhabdomyolyse associée à une myoglobulinurie dans les cas sévères (Vladutiu *et al.*, 2000). Il s'agit d'une myopathie liée à une simple mutation (R503C) du gène CPT2.

1.3.2.5 Le gène de l'enzyme de branchage pour le glycogène (GBE)

La déficience de l'enzyme de branchage pour le glycogène (GBE) serait responsable d'une maladie néonatale fatale chez les poulains Quarter-Horse (Ward *et al.*, 2003). Cette maladie ressemble à une anomalie de stockage de glycogène de type IV (GSD IV) retrouvée chez l'homme. Par marquage génétique, tous les poulains affectés par GSD IV étaient homozygotes pour un allèle de GBEms1 déterminé par microsatellite, contrairement aux animaux sains qui montraient une différence allélique significative. Il existe donc un gène candidat, GBE1 locus en équine.

1.3.2.6 Le gène SCN4A

La paralysie périodique due à l'hyperkaliémie (HYPP), vue précédemment, est une maladie autosomale dominante avec une incidence de 4% chez les Quarter Horse. La maladie se manifeste par des fasciculations et des faiblesses musculaires allant jusqu'à la paralysie. L'hyperkaliémie est due à une mutation de substitution (C en G) qui entraîne l'échange d'une phénylalanine en leucine sur la sous-unité alpha du canal de sodium voltage dépendant (gène SCN4A). Le canal étant inactivé, le flux entrant de sodium et le flux sortant de potassium augmentent (Finno *et al.*, 2008).

1.3.2.7 Le gène GYS1

La myopathie de stockage de polysaccharide (PPSM) est une glycogénose avec une accumulation de glycogène dans les muscles squelettiques chez les chevaux adultes de races lourdes ou Quarter horse (McCue *et al.*, 2008). Le gène GYS1 qui code pour la glycogène synthétase (GS) du muscle squelettique est un gène candidat pour la PPSM. L'analyse de la séquence d'ADN a révélé une mutation de substitution au niveau d'une région très conservée de GS. Dans les PPSM, l'activité de GS est augmentée avec présence de cette mutation (McCue *et al.*, 2008).

1.3.2.8 Les gènes mitochondriaux

Chez l'homme, de nombreuses mutations responsables de myopathies ont été observées sur 37 gènes mitochondriaux mais n'ont jamais été identifiées chez le cheval. Le génome mitochondrial est 10 fois plus « mutable » que le génome nucléaire. Cliniquement, on observe une forte lactémie pour un exercice modéré accompagnée d'autres troubles au niveau du système nerveux central.

Les formes sont très variables selon la fréquence de la mutation ou de la délétion.

1.3.3. Les puces ADN ou microarray ou damier ADN

Chez l'homme, l'utilisation de puces à ADN a permis l'étude des myosites (Zhou *et al.*, 2004). Effectivement, sur des biopsies musculaires de patients atteints de myosites, des gènes surexprimés d'origine immunitaire et des gènes sous exprimés d'origine musculaire ont été mis en évidence. Ainsi, les profils génétiques de myosites soulignent une altération des protéines musculaires et de la régulation immunitaire. Les puces à ADN ont contribué à la révolution de la génomique.

1.3.3.1 Principe

Une puce à ADN est un ensemble de séquences nucléotidiques monobrin (fragments d'ADN) fixées sur un support de type lame de verre. Cette biotechnologie récente permet de visualiser les gènes exprimés (transcrits) dans une cellule d'un tissu donné (foie, intestin...), à un moment donné (embryon, adulte...) et dans un état donné (malade, sain...). Les séquences d'ADN fixées sont généralement appelées des sondes. Des milliers de sondes peuvent être fixés sur une même puce (Jeansoule, 2006): plusieurs transcrits par gène et tout le génome peut être couvert.

1.3.3.2 Différents types de puces ADN

1.3.3.2.1 Les puces à ADNc.

Elles sont issues des produits d'amplification de PCR. La taille de la séquence de la sonde est de l'ordre de 1 kilo bases (kb) = 1000 nucléotides (nt).

1.3.3.2.2 Les puces à Oligonucléotides.

Elles dérivent à l'origine d'un projet de séquençage par hybridation. Ce sont des oligonucléotides synthétisés *in vitro* et dont la taille de séquence est de l'ordre de 50 nucléotides. La spécificité des puces à oligonucléotides est plus grande que celle des puces à ADNc. Il existe plusieurs types d'oligonucléotides : oligo longs de 50 nt, oligo courts 13 nt.

1.3.3.3 Applications génétiques.

Les puces à ADN permettent donc d'étudier l'expression de plusieurs milliers de gènes ou d'un génome entier. La comparaison de 2 expériences de puce à ADN sur 2 cellules du même type, saine ou pathologique, peut permettre de découvrir des gènes exprimés uniquement dans la cellule saine ou uniquement dans la cellule pathologique, et donc fournir des informations sur l'implication de ces gènes dans une maladie. Elles constituent donc de nouveaux outils de diagnostic.

Cette biotechnologie a déjà été utilisée sur les mitochondries de différents types d'espèces (Crimi *et al.*, 2005) De même au sein de l'unité du Service de Génomique Fonctionnelle du CEA d'Evry, des puces ADNc et oligonucléotidiques humaines et murines ont déjà été conçues et validées par le Réseau National des GENOPOLES (Le Brigand *et al.*, 2006). Des études sur le cheval utilisent des puces oligo équine hétérologues Cheval/Souris (Barrey *et al.*, 2006 ; Girke *et al.*, 2000 ; Mucher *et al.*, 2006).

1.3.3.4 Une puce oligonucléotide équine

La première puce à ADN oligo équine, comportant à la fois la totalité des gènes mitochondriaux équins et des gènes équins nucléaires du métabolisme énergétique musculaire a été fabriquée par l'équipe du LEPHE, GENOPOLE - Université d'Evry Val d'Essonne, en collaboration avec le Laboratoire Génomique Fonctionnelle (LGF) (Jeansoule, 2006 ; Valberg et Hodgson, 2002).

La puce équine ouvre de nouvelles perspectives sur l'étude :

- de l'expression génétique des gènes et éventuellement la découverte de réseaux de régulation et d'interactions ;
- des voies métaboliques musculaires en relation avec le type d'exercice ;
- à plus long terme, des pathologies musculaires spécifique du cheval d'origine génétique.

Enfin comme l'ensemble des puces à ADN, elle est utilisable pour détecter si un cheval est sain ou atteint d'une anomalie

En résumé, l'étude de la pathogénie des affections a fait progresser la connaissance des processus physiologiques normaux. Ainsi une affection qui se révèle être la conséquence d'un déficit enzymatique ou hormonal, dévoile le rôle et la place de cette enzyme ou de cette hormone dans la physiologie. La génétique moléculaire en faisant apparaître les gènes en cause lors d'anomalies ou d'affections héréditaires, permet d'accéder plus en amont et analyse le processus normal jusqu'à son déterminisme moléculaire. Un exemple de

l'importance de cette étude des anomalies génétiques dans l'enrichissement des connaissances physiologiques est la mise en évidence de la mutation causale de la rhabdomyolyse à l'effort récurrente. En plus de cet enrichissement des connaissances fondamentales, l'étude moléculaire des malformations et maladies génétiques a des conséquences directement applicables à l'élevage. En effet, l'utilisation massive de très bons reproducteurs, dans les espèces équine restreint le noyau de sélection. L'identification des mutations causales de ces anomalies devient donc indispensable en raison des conséquences économiques et zootechniques que représente la transmission de ces tares. Cet objectif ne peut être atteint qu'avec l'utilisation d'outils génétiques performants. Pour ce faire, seuls des outils miniaturisés d'analyse à haut débit comme les puces peuvent permettre d'aborder la complexité du problème.

2 Travail expérimental : Mise en évidence des gènes responsables de rhabdomyolyses

Dans les RER, il existe donc des facteurs de risque (femelle jeune...), des signes cliniques, biologiques, des anomalies histologiques et des particularités génétiques. Ces facteurs classant permettent une définition précise des maladies. Le but de notre travail s'est focalisé sur des hypothétiques particularités génétiques dans les RER. Les puces à ADN ont été utilisées puisque leurs principales applications sont :

- L'analyse du transcriptome : Mesure du niveau d'expression de l'ensemble des gènes et mise en évidence de gènes candidats
- Le génotypage : Mise en évidence de régions chromosomiques d'intérêt
- Le reséquençage : Mise en évidence de mutations ponctuelles et délétions

2.1 Validation de la méthode utilisée (Mucher et al., 2006)

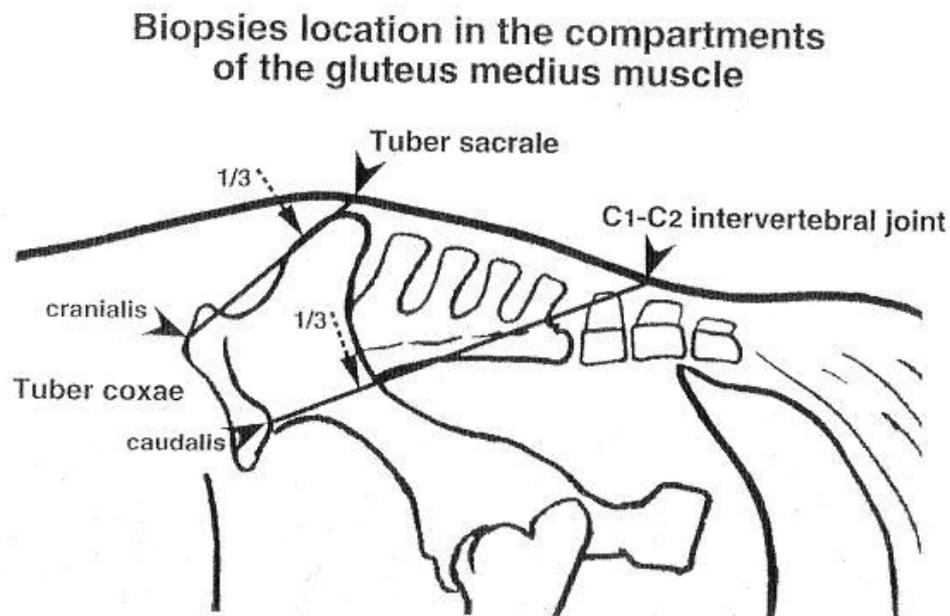
2.1.1. Animaux matériels et méthode

2.1.1.1 Chevaux et biopsies musculaires

Des biopsies du muscle *gluteus medius* et du muscle *longissimus dorsi* ont été réalisées de façon standardisée sur 4 Trotteurs Français. Il s'agissait de 2 juments et de 2 hongres de 3, 5, 8 et 14 ans.

Nous avons effectués les biopsies selon le modèle d'une étude faite sur 41 trotteurs français d'âge et de sexe variable (Valette *et al.*, 1999). Des biopsies ont été effectuées de façon standardisées. La localisation des biopsies pour le compartiment dorsal du muscle *gluteus medius* est au tiers de la distance entre le tuber sacral et le tuber coxae et pour le compartiment ventral au tiers de la distance entre le tuber coxae et la jonction intervertébrale entre Cd1 et Cd2. La profondeur de la ponction correspond à la moitié de la profondeur du muscle déterminée par échographie. Ceci correspond en moyenne à une profondeur de 33-36 mm pour le compartiment dorsal et de 31-35 mm pour le ventral (figure 6).

Figure 6 : Sites de prélèvement du muscle fessier moyen (Valette et al., 1999)



Les prélèvements musculaires par biopsie ont été réalisés à l'aide d'une aiguille de petit diamètre (2 à 5 mm) (Barrey, 1994). Une troisième biopsie a été réalisée sur le muscle *longissimus dorsi* sur la ligne dorsale 20 cm crânialement au tuber sacral et à 7 cm de la ligne médiane. L'échantillon de 10 à 100 mg est prélevé de 5 à 8 cm de profondeur. Après une tonte et un nettoyage avec un antiseptique, on réalise une anesthésie locale. Après 10 min, on incise jusqu'à l'aponévrose musculaire sur 1cm de longueur. Une aiguille à biopsie dans un pistolet automatique est enfoncée verticalement jusqu'à ce que l'extrémité atteigne une profondeur de 3,5 cm pour le muscle *gluteus* et 2,5 cm pour le muscle *longissimus dorsi*. Au final, un échantillon de 10 à 20 mg de muscle est collecté et déposé immédiatement dans un tube de RNA later™ à -80°C. La solution RNA later™ est du Trizol Reagent (solution mono-phasique de phénol et de guanidine isothiocyanate). Cette solution permet d'isoler l'ARN total des cellules et des tissus et de garder l'intégrité des ARN tout en dissolvant les autres composés. En ajoutant du chloroforme suivi d'une centrifugation, 2 phases se distinguent, aqueuse et organique. Après le prélèvement de la phase aqueuse, par précipitation grâce à de l'alcool isopropyl, l'ARN est retrouvé.

Les biopsies musculaires peuvent se réaliser à l'aide d'un scalpel, d'une aiguille manuelle ou d'un pistolet (figure 7). Cette dernière est la technique de choix avec une forte reproductibilité (Cotrel, 2004).

Figure 7 : Prélèvement à l'aide d'un pistolet automatique et obtention d'une « carotte » musculaire de 20 mg environ.



Il existe différentes méthodes d'analyse biochimique et histologique du muscle:

- méthode de typage histoenzymatique qui différencie les activités enzymatiques des ATPases ;
- méthode de typage par électrophorèse qui sépare les différentes molécules selon leur poids ;
- méthode de typage immunologique (ELISA) qui différencie les propriétés antigéniques des différentes chaînes de myosine lourde.

2.1.1.2 Extraction de l'ARN total

Les tissus sont isolés et du RNA *later*[™] et l'ARN total est extrait grâce à la méthode de Phenol-Chloroforme (TRIZOL[®] reagent). L'intégrité de l'ARN total est vérifiée par électrophorèse dans des microtubules (RNA 6000 Nano LabChip[®]) utilisant du Bioanalyzer³. Chaque ARN LabChip[®] contient un jeu de microtubules interconnectés qui sépare, par électrophorèse, les fragments d'acide nucléique selon leur taille. La concentration est vérifiée par densité optique avec un spectrophotomètre (Nanodrop, 260 nm) qui mesure aussi le ratio 260/280. L'ARN est considéré comme pur quand le ratio d'absorbance 260 nm sur 280 nm est près de 2. L'ARN est finalement stocké à -80°C.

2.1.1.3 Amplification d'ARN

L'ARN total (1µg) est amplifié en utilisant le MessageAmp™ II aRNA kit et son protocole (figure 8). L'amplification des ARNa se fait sur l'amplification d'ARN grâce à la transcription reverse d'oligonucléotide par promoteur T7. L'ADNc peut ainsi fabriquer des centaines de copies d'ARN que l'on nomme ARNa du fait de sa queue poly(A)dénylée. La procédure peut donc se résumer en 5 étapes :

- 1) synthèse d'ADNc avec le promoteur T7 par transcription reverse,
- 2) synthèse du deuxième brin de l'ADNc,
- 3) purification de l'ADNc à double hélice,
- 4) transcription in vitro de multiples ARNa,
- 5) purification des ARNa.

Ces ARNa sont principalement utilisés pour l'analyse par puces génomiques.

La réussite de ce protocole nécessite plusieurs conditions :

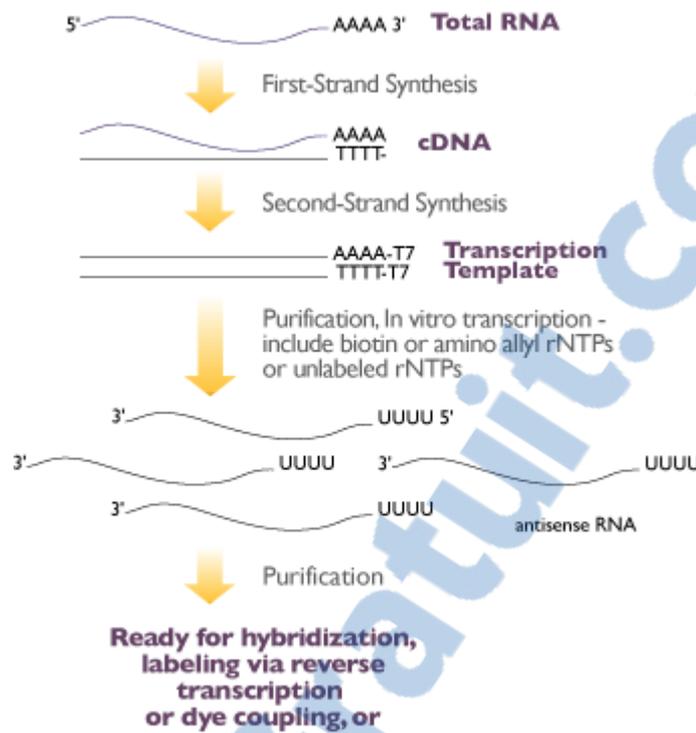
- La quantité d'ARN utilisée doit être de l'ordre de 100 à 2000 ng d'ARN total soit 10 à 100 ng d'ARN poly(A) sélectionné ;
- L'ARN doit être débarrassé de toute molécule contaminante telle que l'ADN, les protéines, le phénol... pour obtenir un ARN purifié ;
- L'intégrité de la molécule d'ARN doit être respectée car plus l'ADNc est court plus le manque de séquence est important.

L'ADNc est fabriqué en 1 jour et l'amplification prend encore 1 jour.

Un cycle thermique est réalisé par incubations à 70°C, 42°C et 16°C. Un incubateur avec des vibrations à 200 rpm est utilisé pour l'incubation nocturne à 37°C.

La synthèse d'ARN amplifié (ARNa avec une queue polyA) par Transcription in Vitro est conçue par NTP non labellisé. L'ARNa total est vérifié par ARN 6000 Nano LabChip®, la concentration et le ratio 260/280 nm sont déterminés par densité optique avec Nanodrop. Les échantillons de ARNa des chevaux sains sont triés par type musculaire et stockés à -80°C.

Figure 8 : Processus d'amplification avec le MessageAmp™ II aRNA kit



2.1.1.4 Reverse transcription

L'ADNc cible est créé à partir des ARNa obtenus après amplification par transcription reverse en utilisant Superscript™ II transcriptase reverse en présence d'hexamères randomisés et de nucléotides amino-modifiés (amino-allyl dUTP).

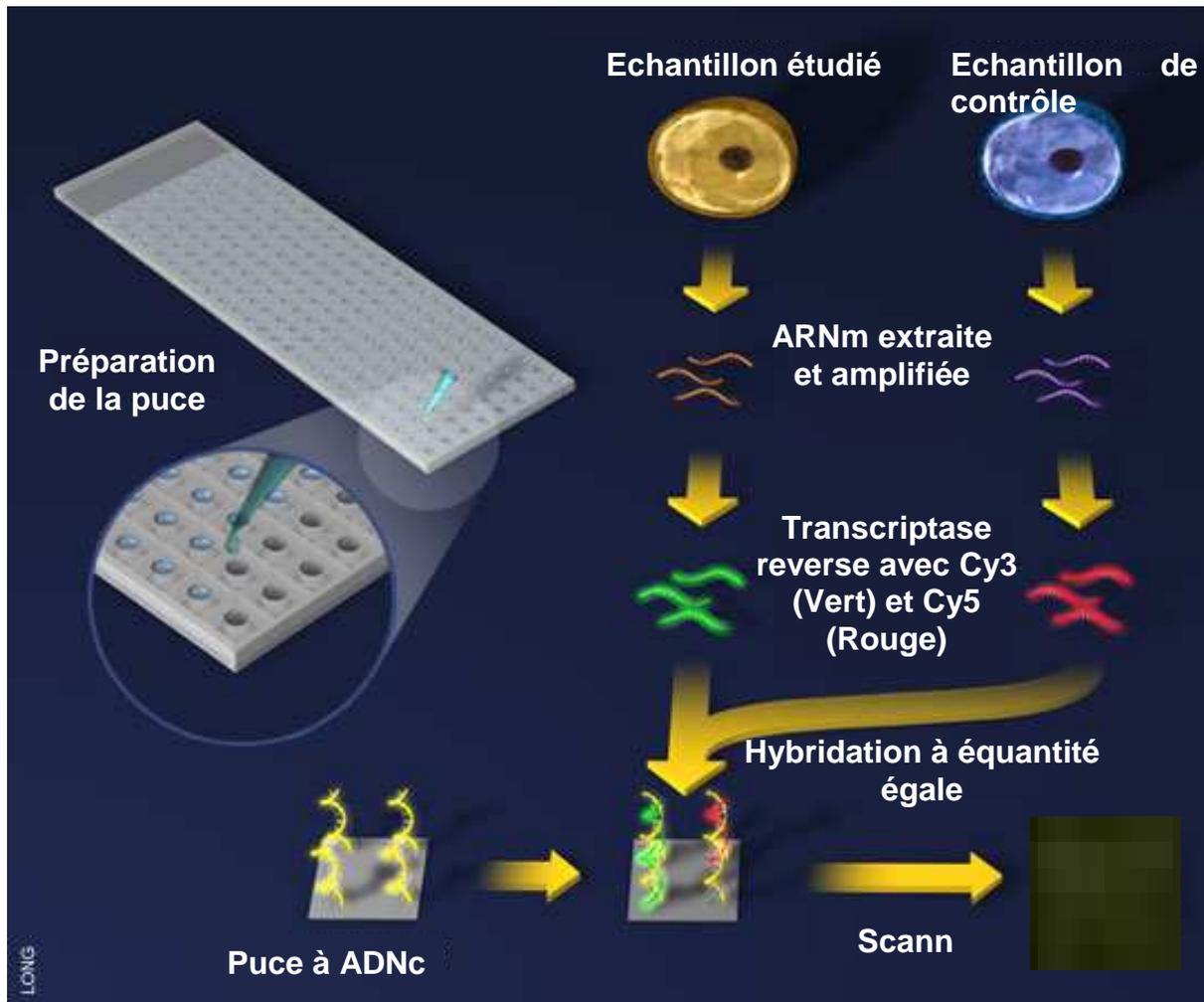
Pour chaque expérience, 1µg d'ARNa total est mélangé avec 2µg de satellites randomisés. Le volume est fixé à 16µL avec de la ARNase sèche et l'échantillon est incubé à 70°C pendant 10min pour permettre l'attache entre le satellite et l'ARNa. Le mélange est ajouté : 1x Reverse Transcription buffer, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 500 µM de chaque dATP, dCTP, dGTP, 100 µM dTTP, 400 µM amino-allyl dUTP et 400 Unités de Superscript II transcriptase reverse dans un volume final de 30 µL. Après incubation à 42°C pendant 2 heures dans un bain marie, l'ADNc est traité avec 2 unités d'ADNase-sans ARNase H à 37°C pendant 15 minutes et après 10 minutes à 70°C pour désactiver les enzymes.

Les nucléotides non incorporés, les sels et les enzymes sont séparés de l'ADNc par centrifugation grâce au filtre YM-30 Microcon. Le volume de chaque ADNc est finalement ajusté à 10 µL par un vacuum rapide. La concentration est déterminée par densité optique avec Nanodrop (260nm). L'ADNc est stocké à -20°C pour la nuit ou à -80°C pour un temps plus long.

2.1.1.5 Production des puces à ADNc

L'analyse d'expression génétique est réalisée en utilisant des puces à ADNc incluant 15 264 gènes uniques de souris (National Institute on Aging, USA). Ces sondes représentent environ 11 000 gènes annotés. La majorité des sondes dérivent des marquages embryonnaires précoces d'ADNc de clones décrits par Kargul *et al.* (Kargul *et al.*, 2001). Les clones sont séquencés du 5' au 3' termini pour obtenir de plus longues lectures et pour vérifier la séquence. Les informations concernant les séquences sont visibles sur le site Internet suivant : <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/15k.html>. Les fragments d'ADNc (1500 bases de taille moyenne) sont amplifiés par PCR au IIGB (International Institute of Genetics and Biophysics, Italie) et BioGeM (Italie). Les puces sont préparées en imprimant des sondes amplifiées, déposées sur un tampon spot composé de 50 % diméthyl sulfoxyde (DMSO) et de TE sur des plaques en PolySilane (CMT GAPS II, Corning), avec un robot Microgrid II au Service de Génomique Fonctionnelle du CEA (Commissariat à l'Energie Atomique, Evry, France).

Figure 9 : Etapes d'hybridation des puces ADN



2.1.1.6 Hybridation

Trois tests sont réalisés pour valider l'hybridation d'ADNc équie avec des puces souris (tableau 2). Plusieurs échantillons sont utilisés pour chaque test en tant qu'échantillon étudié et échantillon de contrôle.

Tableau 2 : Protocole des tests d'hybridation.

Test	Inter-spécifique	Reproductibilité	Comparaison musculaire
Echantillon étudié=pool	Gluteus medius	Gluteus medius	Gluteus medius
Echantillon de contrôle	ARN de souris de référence universelle	Gluteus medius	Longissimus dorsi

Les échantillons étudiés (pool) sont hybridés avec un échantillon contrôle qui est différent selon le test inter-spécifique, le test de reproductibilité et le test de comparaison musculaire.

2.1.1.6.1 Test inter-spécifique

Les variations d'expression génétique du muscle *gluteus medius* (échantillon étudié) sont comparées avec l'ARN universel de souris (échantillon contrôle). Dans ce test, il y a compétition entre l'ADNc équine et l'ADNc souris pour hybrider l'ADNc de souris de la puce.

2.1.1.6.2 Test de reproductibilité

Les variations d'expression génétique sont mesurées entre l'échantillon étudié et lui-même pris pour échantillon contrôle. L'échantillon contrôle et l'échantillon étudié sont composés à partir du même pool du muscle *gluteus medius* de chevaux sains. Ce test évalue la variabilité de la méthode. De plus, il détermine les valeurs d'expression des ratios qui peuvent être considérées comme les limites pour qualifier un gène de sous ou surexprimé.

2.1.1.6.3 Test biologique de comparaison musculaire

Les variations d'expression génétique entre le *gluteus medius* (échantillon étudié) et le *longissimus dorsi* (échantillon contrôle) du cheval au repos sont comparées.

2.1.1.6.4 Méthode d'hybridation: protocole d'hybridation adaptée par Benchaouir et al., 2004

Après purification de l'ADNc amino-modifié, les fluochromes de Cyanine 3 (Cy3) ou Cyanine 5 (Cy5) sont couplés avec l'échantillon étudié et l'échantillon contrôle par méthode indirecte : les groupes ester des fluorochromes sont liés aux groupes amino-allyl eux-mêmes incorporés à l'ADNc pendant la transcription reverse. Les cibles marquées sont ensuite mélangées et hybridées sur la même plaque pour comparer juste en suivant les deux populations d'acides nucléiques. Pour chaque échantillon, il a été réalisé un « dye-swap » pour dupliquer les mesures et éviter l'asymétrie entre les affinités de Cy3 et Cy5. Les deux résultats sont ensuite moyennés.

Les ADNc purifiés et labellisés sont mélangés avec 10 µg de poly d(A) ARN, 10 µg d'ARNt, 10 µg de Cot 1 ARN souris, puis précipités avec 0,5 volumes de 7,5 M d'acétate d'ammonium et 2,5 volumes d'éthanol, et par centrifugation à 16 000 g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est lavé une fois avec 700 µL d'éthanol à 70%. Les échantillons sont centrifugés à 16 000 g pendant 15 minutes à 4°C. L'ADNc du culot est séché au vacuum pendant 1 minute et dissous dans 40 µL de mélange d'hybridation préchauffé à 42°C: 28 % Formamide, 0,1 x Denhardts, 0,7 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), et 6 x Saline Sodium Phosphate EDTA (SSPE). Le mélange est vortexé puis incubé pendant 1 heure minimum dans un bain d'eau chauffée à 42°C afin de dissoudre l'ADNc résiduel. Chaque plaque est réhydratée au-dessus d'eau bouillante et d'UV cross-linked à 254 nm/260 mJ. Les plaques sont pré hybridées dans 0.6 % de Sérum d'Albumine de bovine (BSA), 6 % SDS, et 2,1 x Citrate de sodium standard (SSC) pendant 30 minutes à 50°C. Les plaques sont plongées pendant 1 minute dans de l'eau puis 1 minute dans de l'isopropanol. Elles sont séchées par centrifugation pendant 7 minutes à 100 x g. La sonde est chauffée pendant 2 minutes à 100°C et placée entre une plaque et le couvercle. Les puces sont mises en incubation la nuit dans un bain d'eau chauffée à 42°C dans une chambre humidifiée contenant les plaques (Corning) puis lavées dans un premier bain de 0,1 x SSC avec 0,1 % SDS pendant 15 minutes suivi de 2 lavages dans 0,1 x SSC pendant 10 minutes chacun à température ambiante, avec agitation et à l'abri de la lumière. Les puces sont séchées par centrifugation à 100 x g pendant 7 minutes. Les images d'intensités de fluorescence de Cy3 (532 nm) et Cy5 (635 nm) sont scannées séparément avec le scanner GenePix 4000B laser.

2.1.1.7 Analyses des données

2.1.1.7.1 Analyse des images

La précision des images (10 µm/pixel) est analysée grâce à un programme spécifique de traitement d'images de puces (programme GenePix Pro 6,0) qui permet de localiser automatiquement les loci hybrides (transcripts) avec un contrôle manuel. Il permet aussi de quantifier l'intensité de fluorescence sur chaque point. Les données obtenues pour chaque puce sont les intensités de fluorescence pour tous les points correspondant chacun à un gène. Puis ces données sont importées dans le programme Gene Spring pour être traitées et analysées statistiquement. Pour chaque échantillon, l'analyse est dupliquée (dye-swap) et on utilise la moyenne de fluorescence des deux hybridations. Enfin, les données sont normalisées pour chaque locus et chaque puce avec la méthode de normalisation de Lowess régression afin de standardiser et linéariser la relation entre les données observées et le contrôle (Quackenbush, 2002).

2.1.1.7.2 Filtrage des gènes significatifs et statistiques

Un filtrage, en deux phases, a permis d'obtenir une liste des gènes significativement modulés comparée à l'échantillon contrôle :

- Seule la liste des gènes avec un signal fluorescent suffisant est sélectionnée pour l'analyse statistique. Une valeur seuil de 2000 a été prise pour la somme des fluorescences des deux médianes (Cy3 + Cy5 > 2000) afin d'éliminer les signaux fluorescents en bruit de fond. La valeur de 2000 correspond à la limite du dernier quart de la distribution de fluorescence.
- D'après le test de reproductibilité, le ratio 1,4 est appliqué pour sélectionner les gènes sous et sur exprimés. Lorsque le *gluteus* est hybridé avec lui même, la distribution des gènes montre que la plupart des gènes sont inclus dans les ratios [1/1,4 – 1,4].

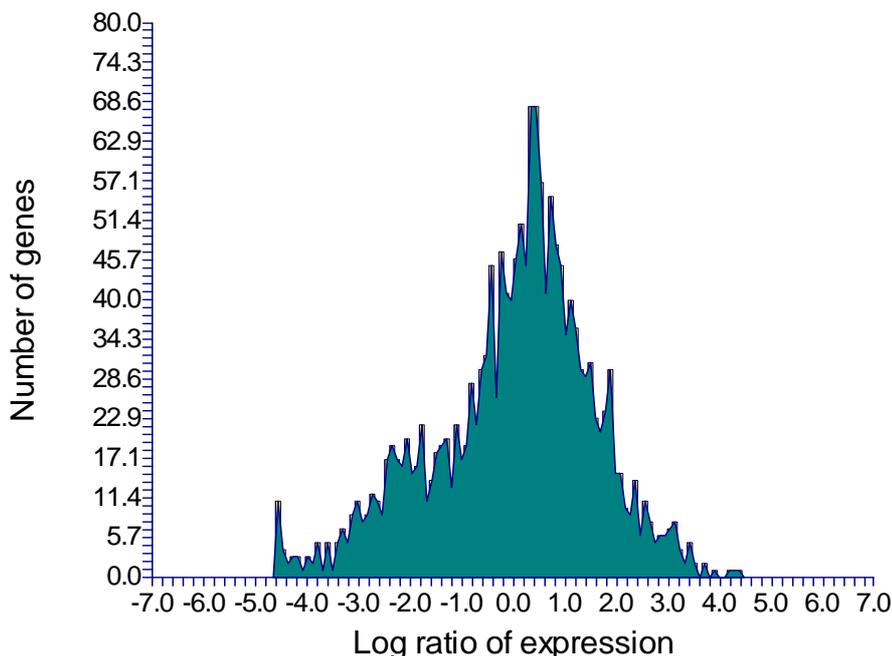
Les statistiques descriptives, les tests de normalité et l'analyse de Lowess sont utilisés pour analyser les résultats. Les résultats d'expression génétique sont classés d'après la base de données d'ontologie génétique (David GO Chart). Seuls les gènes significatifs avec une probabilité $p < 0,05$ (test de Fisher) sont listés par catégorie.

2.1.2. Résultats

2.1.2.1 Test inter-spécifique

Tous les contrôles positifs de gènes (GAPDH, HPRT et beta-Actin) ont été hybridés avec de l'ADNc équin et aucun des contrôles négatifs de gènes ne l'a été (levure, plante). Ces résultats permettent de vérifier la spécificité de l'hybridation d'ADNc sur des puces souris (figure 10). Le nuage de points montre l'hybridation d'ADNc équin du *gluteus medius* contre de l'ADNc souris universel sur des puces souris (données moyennes par dye-swap). Un total de 1696 gènes a un signal fluorescent significatif supérieur à 2000. La valeur (sd) du ratio normalisé est de 2,87 (6,55) avec des valeurs extrêmes (Min-Max) dans la tranche [0,01 - 152]. 587 gènes sont surexprimés avec un ratio supérieur à 1,4 et 801 gènes sont sous exprimés avec un ratio inférieur à 0,71. La distribution des Log ratio d'expression génétique n'est pas symétrique et montre plus de gènes sous exprimés. Le test de normalité du Log ratio est rejeté ($P > 0,05$). Même en présence d'une cible spécifique souris pour la compétition (ADNc équin contre ADNc souris), la distribution souligne une forte hybridation de l'ADNc équin du muscle *gluteus* ce qui indique que de nombreux ADNc équin s'apparient très bien avec les sondes d'ADNc de la puce.

Figure 10 : Distribution de l'expression de l'ADNc du *gluteus medius* avec l'ADNc de souris universel en log ratio.

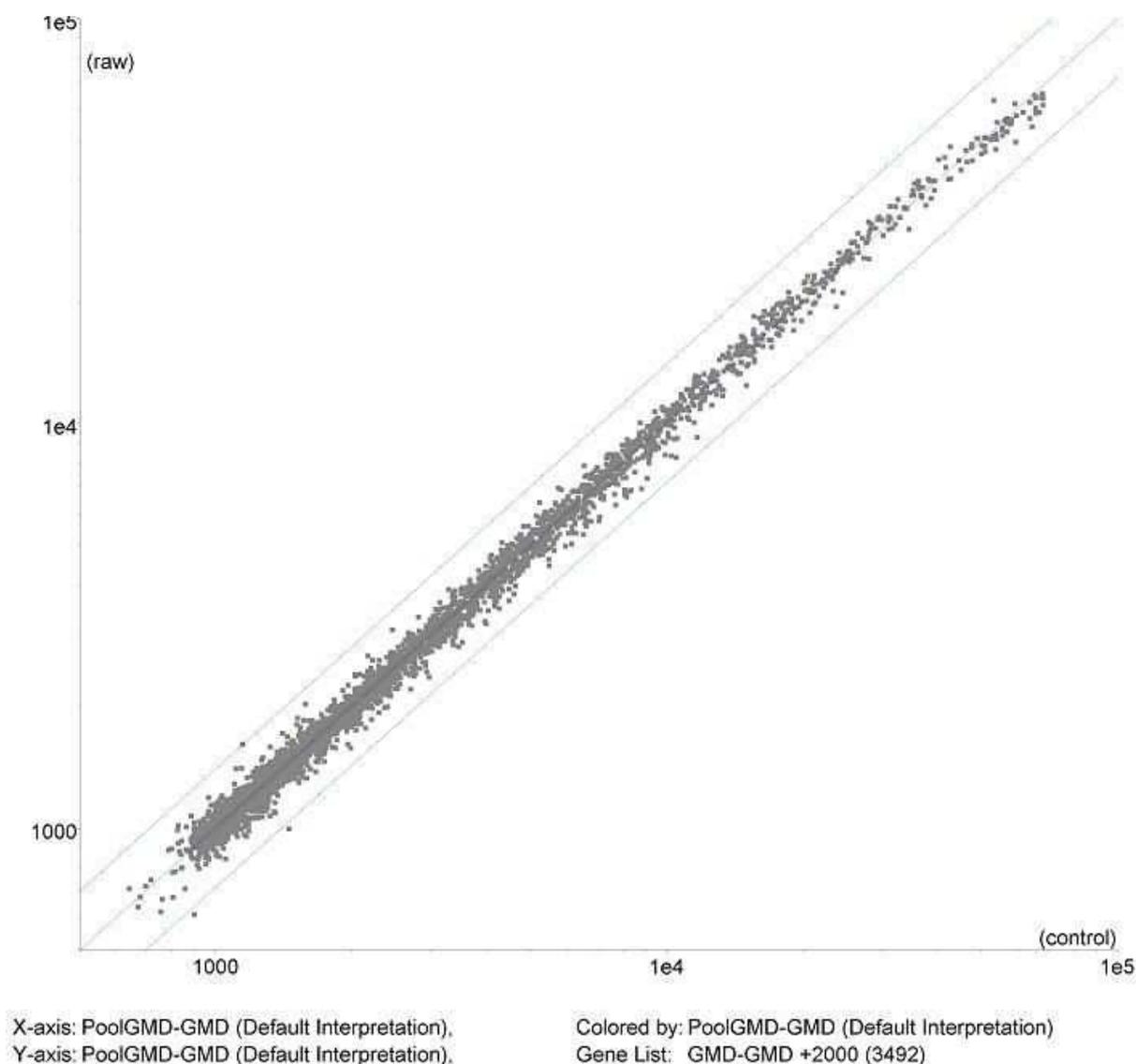


L'ADNc équin est donc très compatible avec l'ADNc souris de la puce.

2.1.2.2 Test de reproductibilité

L'hybridation d'ADNc équin du muscle *gluteus* avec lui-même montre une relation significativement linéaire avec un coefficient de pente = 1,0018, intercept = -0,0083 et $R^2 = 0.9953$ ($p < 0,0001$) ce qui indique une excellente linéarité après normalisation des données du dye-swap pendant l'hybridation hétérologue (figure 11). Le ratio normalisé de l'expression est de 0,9988 ($p=7,04 \cdot 10^{-2}$); p étant supérieur à 0,05, le ratio n'est donc pas significativement différent de 1. Il n'y a pas de différence significative entre la valeur de fluorescence des valeurs brutes et des données de contrôle. Un total de 3492 gènes sont hybridés (signal fluorescent > 2000). Seulement 1 gène a une expression supérieure à 1,4 et 3 gènes une expression inférieure à $1/1,4 = 0,71$. Ainsi, 99,9988 % de la distribution des ratios se situent dans les limites [0,71 – 1,4]. Un gène est donc sous exprimé lorsque le ratio est inférieur à 0,71 et un gène sur exprimé lorsqu'il est supérieur à 1,4.

Figure 11 : Nuage de points fluorescents d'ADNc de *gluteus medius* avec lui-même.



La corrélation est linéaire avec $R^2 = 0,9953$ très significatif. Les deux droites déterminent les limites de surexpression et de sous expression des gènes. Dans ce test de réplication, plus de 99,99 % des gènes ne sont pas modulés au dessus ou en dessous des limites.

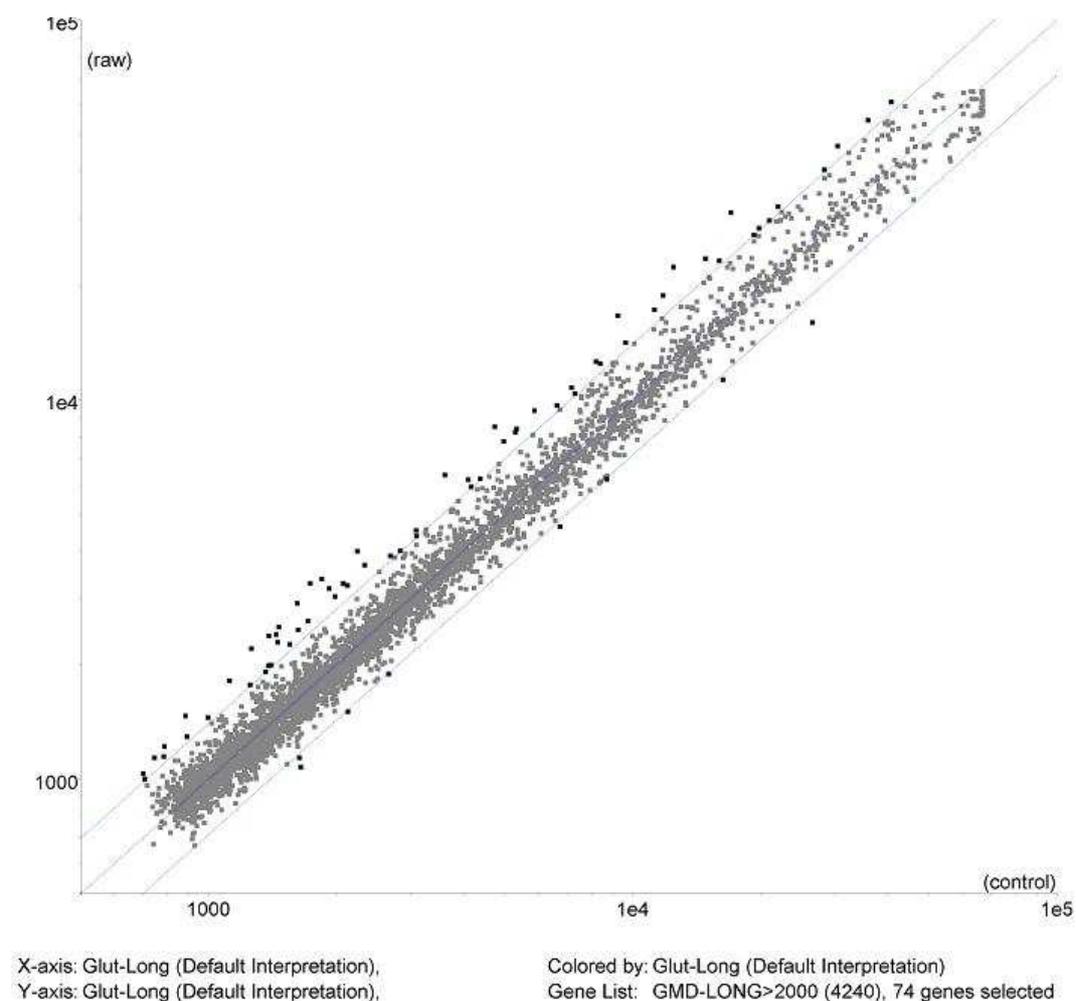
2.1.2.3 Test de comparaison musculaire

Un total de 71 gènes significativement modulés est observé entre le *gluteus medius* et le *longissimus dorsi* (figure 12). Un total de 4240 gènes sont significatifs avec pour un ratio de 1,0078 (0,1751) et des expressions extrêmes de ratio comprises dans l'intervalle [0,61 – 8,31]. Parmi eux, 63 gènes sont sur exprimés (ratios >1,4) et 8 gènes sous exprimés (ratios < 0,71) dans le *gluteus*

medius comparé au *longissimus dorsi*. Afin de souligner les fonctions majeures de ces gènes modulés ($n = 71$), nous les avons classés selon la base de données d'ontologie génétique (figure 13). Dans chaque catégorie de fonction génétique, certains gènes sont significativement ($p < 0,05$) modulés parmi le nombre total de gènes compris dans la même catégorie et présents sur la puce. Certains gènes sur exprimés intéressants ont été extraits de cette liste :

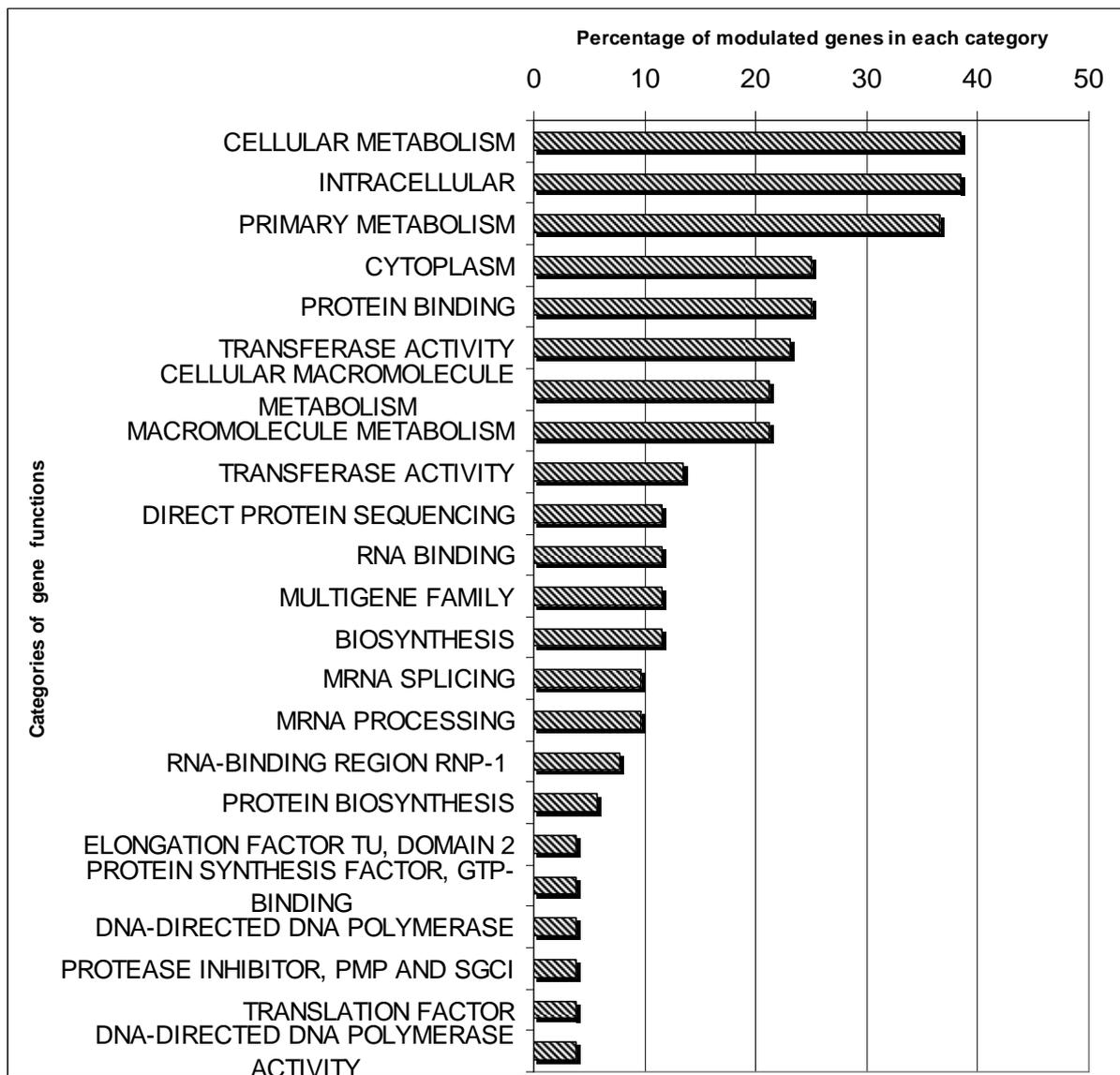
- procollagène, type III alpha 1,
- decorin : rôle dans la régulation de la formation de fibre de collagène,
- protéine erythrocyte band 4.1-like 5,
- alpha héoglobine, chaîne adulte 1,
- tenascin C: rôle dans le développement de la jonction neuromusculaire,
- récepteur interleukin-1 associé kinase 1,
- glutathione S-transférase, alpha 4,
- chaîne lactate déshydrogénase 2, B.

Figure 12 : Distribution des différents ratios d'expression génétique entre le *gluteus medius* et le *longissimus dorsi*.



Un total de 4240 gènes dont 63 gènes surexprimés (ratio > 1,4) et 8 gènes sous exprimés (ratio < 0,71) ont un signal significatif.

Figure 13 : Classification par catégorie fonctionnelle des gènes modulés dans le *gluteus medius* par rapport au *longissimus dorsi*.



En conclusion, les puces ADN peuvent donc être utilisées pour hybrider l'ADNc équine issue de l'extraction d'ARN des tissus musculaires. La comparaison des profils génétiques entre animal sain et pathologique permet donc de corréler les changements métaboliques liés aux maladies aux différences génétiques.

2.2 Application avec des chevaux atteints de rhabdomyolyses

2.2.1. Animaux matériel et méthode

2.2.1.1 Les animaux

Une fois la méthode d'analyse musculaire par puce ADN validée, la même méthode que précédemment a été utilisée sur un nombre plus large de chevaux sains et sur des chevaux atteints de rhabdomyolyses. Ainsi, les biopsies du muscle *gluteus medius* et du muscle *longissimus dorsi* ont été réalisées de façon standardisée sur 16 Trotteurs Français, dont 6 malades. Il s'agissait pour les témoins de 4 juments et de 6 hongres de 3, 5, 8 et 14 ans. Pour les chevaux atteints, il y avait 4 juments et 2 hongres de 4 et 5 ans. Les chevaux présentant des symptômes de rhabdomyolyses étaient tous à l'entraînement. Tandis que les chevaux sains étaient au repos. Les chevaux malades ont été sélectionnés selon plusieurs critères : valeurs enzymatiques élevées et/ou signes de courbatures musculaires et/ou réticence à l'effort. Les chevaux atteints de rhabdomyolyses ont été biopsés dans les 48 h après avoir présenté les premiers symptômes de rhabdomyolyse. Les animaux malades ont eu un examen clinique complet et les premiers soins. Une prise de sang a été effectuée sur chaque cheval (témoin ou atteint) pour évaluer entre autres la concentration des CPK et SGOT (tableau 3).

Tableau 3 : Résultats des analyses biochimiques réalisées sur les chevaux témoins et des atteints

	Cheval	Age	Sexe	SGOT (UI/l)	CPK (UI/l)
Témoins	Jupiter	8	M	148	5568
	Deister	14	M	174	160
	One Star	4	F	185	307
	Hostis Avis	10	M	191	145
	Maya	6	F	199	289
	Opaline de Cuisier	4	F	199	289
	Opaline d'Oudon	4	F	328	292
	Osman Boulba	4	M	343	314
	Open d'Amour	4	M	299	273
	Okapi	4	M	288	171
Atteints	Natif	5	M	730	6900
	Nasica	5	F	Non communiqué	7200
	Jezabelle	8	F	6370	7080
	Océane Mazurie	4	F	15250	24500
	Océlia	4	F	900	269

Le site de ponction est primordial pour diagnostiquer les affections musculaires (Valberg, 1999). Dans le cas de rhabdomyolyses, il est intéressant de prélever le muscle épiaxial (*longissimus dorsi*) et le fessier moyen pour identifier le type de rhabdomyolyse.

Lors de RER, les muscles fessier moyen et semi-membraneux sont les plus souvent biopsiés. Le muscle *longissimus* peut aussi être choisi lors de manifestations dorsales douloureuses. Les biopsies musculaires chez ce type de chevaux ont montré des fibres vacuolées et fragmentées, avec une infiltration macrophagique. Dans ce cas, les fibres nécrosées sont principalement des fibres IIa et IIb.

2.2.1.2 Utilisation d'une puce hybride

Parallèlement à notre étude, une puce équine a été réalisée et des puces hybrides souris/équine ont donc été utilisées pour comparer les chevaux malades avec les chevaux sains.

La première puce à ADN oligo équine comportant à la fois la totalité des gènes mitochondriaux équins parfaitement séquencés et connus ainsi que des gènes équins nucléaires codant pour le métabolisme énergétique musculaire a été créée.

2.2.1.3 Hybridation

Afin de comparer les profils génétiques entre un cheval sain et un cheval atteint, le profil de chaque cheval atteint a été comparé avec un pool (tableau 4). Ce dernier est constitué de tous les profils génétiques des chevaux sains et représente la référence par rapport aux animaux atteints.

Tableau 4 : Hybridations de comparaison

Echantillon témoin=pool des chevaux sains	Muscles sains (glutéus et longissimus)
Echantillon étudié = chaque cheval malade	Muscles malades

2.2.1.4 Analyse des données à l'aide d'outils bioinformatique de « Data mining »

Les services d'analyse de transcriptome sont indispensables pour explorer les gènes modulés. Gene ontology, David, Ingenuity sont des bases de données d'annotation du génome et de ses régulations qui aident l'interprétation des résultats d'expressions souvent nombreuses.

Ces outils facilitent:

- l'identification et la classification des gènes ;
- la compréhension de la maladie d'un point de vue génétique ;
- l'explication physiopathologique d'une maladie par l'identification de gènes qui doivent être confirmés ;
- l'identification et le classement de biomarqueurs en rapport avec l'expression des gènes ;
- l'analyse et l'interprétation de l'ensemble des données ;
- la présentation des résultats pour des publications.

Les données ont donc été analysées avec Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). A partir de valeurs d'hybridation, Ingenuity a mis en évidence les gènes exploitables.

La base de données contenant les identifiants des gènes et les valeurs d'expression correspondantes est enregistrée dans l'application. Chaque identifiant est attribué à un gène de la base d'Ingenuity Pathways Knowledge. Chaque gène significativement régulé est ensuite identifié. Ces gènes, appelés Focus Genes, sont enregistrés pour déterminer un réseau de connexion entre eux de façon algorithmique.

Une analyse fonctionnelle identifie les différentes fonctions biologiques les plus significatives. Le test de Fischer est utilisé pour calculer la valeur de p qui détermine la probabilité d'erreur correspondant aux données uniquement par hasard.

Enfin, une représentation graphique des gènes par fonction est réalisée à partir de Network/My Pathways Graphical Representation.

2.2.2. Résultats

Après l'analyse d'Ingenuity, le profil génétique d'un animal atteint de rhabdomyolyses par rapport au témoin a permis disposition différents classements de gènes d'identifier 159 gènes significativement différents entre animaux sains et malades. Ingenuity a mis à disposition différents classements de gènes.

2.2.2.1 Classification des 5 groupes de gènes (Clusters) les plus représentatifs (tableau 5)

Tableau 5 : Classification par clusters des gènes significativement différents entre animaux malades et sains

Clusters avec les gènes les plus représentatifs	Nombre de gènes représentatifs	Fonctions
BCL6, CUBN, CYP19A1, DVL2, H2AF2, IL12B, LUM, RFC4, RPL23, SDCBP2, SNRP70, TNFRSF13B , TNFSF12 et TXN	29	Dégénérescence cellulaire et apoptose
APP, ITGAL, ITGB1, ITGB2, LTBR, MME et RAPTOR	12	Inflammation et renouvellement cellulaire
ADCY9	2	Métabolisme cellulaire
GSTO1	2	Troubles cardio-vasculaires
SNAPC5	2	Expression génétique

Chaque cluster représente un groupe de familles. Chaque famille peut elle-même être divisée en plusieurs fonctions. On peut souligner que les clusters de l'inflammation et de l'apoptose sont les plus représentés.

2.2.2.2 Classification des 3 fonctions biologiques les plus représentatives (tableau 6)

Tableau 6 : Représentation des 3 biofonctions majoritaires

Maladies et troubles	Probabilités	Nombre de gène
Inflammation	$3,83^{E-06} - 1,16^{E-02}$	10
Dégénérescence cellulaire	$9,38^{E-05} - 1,71^{E-02}$	12
Troubles immunologiques	$9,38^{E-05} - 1,77^{E-02}$	9
Troubles neurologiques	$1,08^{E-04} - 1,71^{E-02}$	7
Troubles organiques	$1,80^{E-04} - 171^{E-02}$	7

Fonctions moléculaires et cellulaires	Probabilités	Nombre de gène
Communication inter-cellulaire	$4,11^{E-06} - 1,71^{E-02}$	7
Mouvement cellulaire	$9,81^{E-06} - 1,71^{E-02}$	9
Métabolisme lipidique	$1,81^{E-05} - 1,71^{E-02}$	6
Biochimie moléculaire	$1,81^{E-05} - 1,71^{E-02}$	9
Maintenance et fonction cellulaire	$1,81^{E-04} - 1,71^{E-02}$	6

Système physiologique et développement cellulaire	Probabilités	Nombres de gènes
Système d'hématologie	$4,11^{E-06} - 1,71^{E-02}$	10
Système immunitaire et lymphatique	$4,11^{E-06} - 1,71^{E-02}$	8
Système tissulaire	$4,11^{E-06} - 1,71^{E-02}$	10
Réponse immunitaire	$9,81^{E-06} - 1,71^{E-02}$	11
Système cardiovasculaire	$7,48^{E-05} - 1,71^{E-02}$	6

Plus la probabilité d'erreur est faible, plus l'anomalie est significativement différente entre animaux sains et malades.

2.2.2.3 Les 20 gènes les plus représentatifs : sur et sous exprimés dans les muscles atteints

Le programme Ingenuity a permis de mettre en évidence les gènes les plus représentés.

Dans un premier temps, voici les 10 gènes les plus sur-régulés :

➤ LUM

Ce gène code pour un membre de la famille des protéoglycanes riches en leucine. Lumican joue un rôle dans la kératinisation de la cornée et dans la fabrication de la matrice de collagène des muqueuses intestinales. Lumican pourrait réguler la fabrication du collagène des tissus pour leur réparation.

➤ IL12B

Ce gène code pour une sous unité de l'interleukine 12. Cette cytokine induit la formation d'un large nombre de cellules Th1. Ces dernières jouent un rôle dans la protection contre les agents pathogènes intracellulaires. La surexpression de

ce gène a été observée chez des patients atteints de sclérose en plaque. De plus, la mutation de ce gène serait responsable de l'asthme infantile.

➤ ITGB1

Les membres de la famille des intégrines sont des récepteurs membranaires impliqués dans différents processus tels que l'embryogenèse, l'hémostase, la réparation tissulaire, la réponse immunitaire et la diffusion métastatique des cellules cancéreuses.

➤ ITGB2

Le produit de ce gène appartient à la famille de la chaîne bêta des intégrines. Les intégrines participent à l'adhésion cellulaire et à la signalisation en tant que cellule de surface cellulaire.

➤ APP

Ce gène code pour un récepteur de surface cellulaire et un précurseur de protéine transmembranaire. C'est un promoteur de la transcription. Sa mutation serait impliquée dans la maladie autosomale dominante d'Alzheimer.

➤ CYP19A1

Ce gène code pour une enzyme oxydoréductase avec de multiples substrats tels que des facteurs de coagulation, des récepteurs glucocorticoïdes et l'insuline.

➤ RPL23

Ce gène code pour une protéine ribosomale localisée dans le cytoplasme

➤ BCL6

Ce gène code pour un facteur de transcription. Il a une fréquence de mutation très élevée et serait présent dans certains types de lymphomes.

➤ GSTO1

Ce gène code pour un membre de la famille des transférases de glutathion. Chez la souris, cette protéine agit comme une réponse au stress et joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire.

Dans un second temps, voici les 10 gènes les plus sous-régulés :

➤ SLC25A17

Ce gène code pour une protéine membranaire de peroxyosome qui appartient à la famille des solutés mitochondriaux

➤ ND6

Ce gène code pour la sous unité 6 de la NADH deshydrogénase. Il s'agit d'un gène mitochondrial.

➤ NR2F6

Ce gène code pour un récepteur nucléaire.

➤ PNMA2

Ce gène code pour un antigène paranéoplasique anti-MA2

➤ PDE4D

Ce gène est complexe et présente au moins 9 isoformes différentes codant chacun pour une protéine fonctionnelle. Ces protéines dégradent le second

messenger AMPc. Ce dernier est le signal clé pour toute traduction moléculaire dans de multiples types cellulaires tels que les cellules vasculaires.

➤ IGHE

Ce gène code pour une immunoglobuline.

➤ CD36

Le produit de ce gène est une importante glycoprotéine de surface plaquettaire. Il sert de récepteur aux thromboplastines et est impliqué dans différents procédés d'adhésion. La mutation de ce gène entraîne une déficience glycoprotéique des plaquettes.

➤ ARHGEF7

Ce gène code pour une Rho GTPase. Cette protéine appartient à la famille des protéines cytoplasmiques qui active les Ras-like en protéines Rho en remplaçant les GDP par GTP. Les Rho GTPases, couplées avec des récepteurs de protéine G, jouent de multiples rôles dans les stimuli extracellulaires.

➤ PRKCA

Ce gène code pour la protéine kinase C, activée par le calcium et le second messenger diacyl-glycérol, elle permet la phosphorylation d'une grande variété de protéines. Cette kinase joue un rôle dans différents processus tels que l'adhésion cellulaire, la transformation ou le contrôle du volume cellulaire. De plus, elle pourrait avoir un rôle dans la régulation du Ca²⁺ dans les myocytes.

➤ SLCA2

Ce gène code pour Glut2, un transporteur de glucose. Il s'agit d'une protéine transmembranaire qui facilite le transport du glucose au niveau du foie, des reins et de l'intestin.

Au total, 159 gènes sous ou sur-exprimés ont été mis en évidence chez les chevaux malades par rapport aux chevaux sains. Ces modifications d'expression pourraient être en relation avec la survenue d'anomalies métaboliques. Pour ce faire, les 159 gènes ont été classés : 1) en clusters (groupes gènes les plus représentés) 2) selon leurs fonction biologique 3) les 10 gènes les plus sur-exprimés et les 10 gènes les plus sous-exprimés. Ainsi, on peut de façon peu spécifique corrélérer la modulation des gènes aux anomalies retrouvées.

3 Discussion

3.1 Discussion de la validation de la méthode

3.1.1. Résultats principaux et évaluations de ces résultats

3.1.1.1 Utilisation de la puce ADN

Dans cette étude, nous avons démontré l'utilité des puces à ADNc avec des séquences de souris de 1500 nucléotides de long qui permettent l'hybridation de séquences de cheval avec un niveau de fluorescence significatif et une expression de ratio.

Les qualités d'une puce, particulièrement lors d'hybridations hétérologues, sont la reproductibilité des données générées, la spécificité de détection des gènes cibles et la validité des résultats qui identifient et établissent les différences d'expression génétique. Les données de cette étude confirment la reproductibilité d'hybridation hétérologue car les puces à ADNc de souris sont hybridées avec l'ADNc de muscle de cheval. Les contrôles positifs et négatifs ont vérifié la spécificité de l'hybridation d'ADNc sur des puces souris. De plus, l'étude de la compétition entre l'ADNc équin et l'ADNc universel de souris démontre que l'ADNc équin peut hybrider une grande partie des sondes murines comme l'ADN universel de souris. Ainsi, les homologies de séquences des gènes permettent une hybridation croisée.

La reproductibilité de l'hybridation hétérologue a été vérifiée grâce à une forte corrélation entre l'échantillon du *gluteus medius* et lui-même. En outre, toutes les analyses de réplique (dye-swap) sur chaque test sont concordantes. Le test de reproductibilité permet aussi de déterminer les valeurs limites du ratio pour les gènes surexprimés ($r > 1,4$) et les gènes sous exprimés ($r < 0,71$). L'asymétrie des valeurs peut être due à la normalisation des données qui n'était pas parfaite. Ces corrélations et ces valeurs limites sont en concordance avec d'autres études de reproductibilité (Novoradovskaya *et al.*, 2005).

3.1.1.2 Comparaison de deux muscles

Hormis les petites différences de composition des chaînes de myosine et de métabolisme énergétique entre le muscle *gluteus* et *longissimus*, des différences ont été observées sur le plan génétique quand les chevaux étaient au repos au moment de la biopsie. La comparaison musculaire détermine ainsi 71 gènes significativement modulés dans le *gluteus medius* par rapport au *longissimus dorsi*. Il y a plus de gènes sur exprimés dans le *gluteus medius* que dans le *longissimus dorsi*. Quelques gènes sont sous exprimés. Les fonctions principales des gènes significativement modulés sont les suivantes : cellulaire,

métabolisme macromoléculaire et primaire dans le cytoplasme, fixation protéique, et activité transférasique. Parmi les gènes sur exprimés, il y a des facteurs de transcription. Nous avons sélectionnés une courte liste de gènes avec des fonctions bien spécifiques.

En effet, le muscle glutéus est un muscle propulseur fortement sollicité au travail tandis que le muscle longissimus est un muscle postural sollicité au repos comme au travail. Les différences de la modulation des gènes peuvent donc expliquer entre autres ces différences fonctionnelles.

3.1.2. Confrontation avec la littérature et projets à venir

3.1.2.1 La puce ADN équine

A cause du manque de connaissance sur la carte génétique équine (200 gènes connus) au moment de nos travaux, il était impossible d'obtenir une puce équine exhaustive avec de nombreux gènes annotés. Cependant, les premières puces équines ont été publiées à partir de 2003. Un registre d'ADNc a été utilisé pour fabriquer une puce à ADNc équine afin d'analyser l'inflammation dans le cas de fourbure (Vandenplas *et al.*, 2005). Une puce à ADNc de cartilage équin a aussi été décrite comprenant 9322 transcriptomes dont certains annotés (McLeod, 2005). Enfin, une puce d'oligonucléotides équins a été créée par ordinateur à partir de séquences génétiques publiées (Gu et Bertone, 2004). Dans une étude récente, des puces souris ont permis d'étudier l'expression génétique du cheval avec un nombre plus important de gènes documentés. Des hybridations hétérologues sont possibles avec des sondes d'ADNc de grande taille (1500 bases) probablement grâce aux importantes homologies des séquences génétiques entre les espèces mammifères. Certains gènes équins ont de grandes homologies avec des séquences de souris ou de l'homme (Chowdhary *et al.*, 2003 ; Milenkovic *et al.*, 2002 ; Ryder, 2005). Des gènes autologues entre humains et souris ou entre humains et rats ont une identité séquentielle d'homologie environ égale à 85 % (Frazer *et al.*, 2003 ; Makalowski *et al.*, 1996). Dans deux études indépendantes l'une de l'autre sur les puces à ADNc et les puces oligonucléotidiques à 50-mer, l'hybridation croisée a été possible seulement avec 70 % - 80 % et 50 % - 75 % des gènes, respectivement, sur la totalité des séquences identifiées (Girke *et al.*, 2000 ; Kane *et al.*, 2000). Les analyses de puces hétérologues ont été réalisées sur d'autres espèces en utilisant de l'ARN de cerveau de singe comme cible pour des puces oligonucléotidiques humaines (Chismar *et al.*, 2002); de l'ARN de porc, de souris ou de saumon sur des puces humaines de nylon (Moody *et al.*; Tsoi *et al.*, 2003) et de la cerveau de fœtus de bovin sur des puces à ADNc humaine (Adjaye *et al.*, 2004). Cette dernière montre ainsi la faisabilité d'utiliser des puces à ADNc humaine pour faciliter la mise en évidence des gènes

orthologues co-exprimés dans les tissus communs entre différentes espèces. Récemment, il a été démontré que les puces à ADNc de souris comme de l'homme peuvent de façon adéquate hybrider les gènes exprimés dans les leucocytes équins à partir d'une prise de sang (Barrey *et al.*, 2005).

3.1.2.2 La puce : un outil de diagnostic pour les affections musculaires ?

Le fessier moyen est l'extenseur principal de la hanche avec une fonction propulsive ; il est facilement accessible pour biopsie à l'aide d'un pistolet automatique et d'une aiguille (Lindholm et Piehl, 1974). Plusieurs études ont été réalisées sur ce muscle. Le fessier moyen a une fonction propulsive plus marquée que le longissimus dorsi, qui joue un rôle dans l'extension du rachis. Le muscle longissimus dorsi a été étudié lors d'entraînement intensif (Gottlieb, 1989) et de myopathies de surcharge polysaccharidique (Quiroz-Rothe *et al.*, 2002). Chez les Pures-sangs, la comparaison des compositions de fibres de ces deux muscles a souligné peu de différences (non significatives): le fessier moyen a plus de fibres rapides (IIA + IIB = 88 %) que le longissimus lombaire (IIA + IIB = 83%) qui est donc plus riche en fibres lentes (MHC I) (Gottlieb *et al.*, 1989). Le *gluteus medius* a plus de potentiel oxydatif que le muscle longissimus en particulier lors d'une période d'entraînement. Bien évidemment, il serait intéressant d'analyser ces gènes des muscles après effort. La sensibilité de la méthode permet de mettre en évidence un profil génétique avec les gènes impliqués dans le métabolisme musculaire. Les puces de souris comprennent 11,000 gènes documentés ce qui correspond à une partie seulement du génome de la souris. En réalité, certains gènes candidats aux pathologies musculaires ne sont pas encore présents sur cette puce à ADNc de souris. La nouvelle technologie des puces à oligonucléotides va permettre d'étudier un plus grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme musculaire et les structures de myofibrilles. Cette puce comprend en effet plus de 25 000 gènes.

3.2 Discussion de l'utilisation des puces ADN pour étudier les troubles fonctionnels des rhabdomyolyses chez les chevaux

3.2.1. Résultats et évaluation des résultats

Nous avons donc étudié 16 chevaux dont 6 atteints de rhabdomyolyses à l'effort et 10 témoins. Les chevaux malades étaient diagnostiqués cliniquement et la mesure des concentrations enzymatiques (CK et AST) venait confirmer le diagnostic. Sur tous ces chevaux, nous avons réalisé des biopsies musculaires

au niveau du fessier moyen et du longissimus dorsi. Ces prélèvements ont permis de réaliser des hybridations avec des puces hybrides. Les puces utilisées sont des puces souris auxquelles ont été ajoutés des gènes équins (334 sur environ 15 000 gènes souris)

Il en ressort 159 gènes très significativement différents entre un cheval sain et un cheval atteint de rhabdomyolyse à l'effort. Les types de gènes retrouvés sont essentiellement ceux de l'inflammation et de la régénération/apoptose. Un grand nombre de gènes ont été mis en évidence sans identifier un gène particulier responsable des rhabdomyolyses à l'effort. Dans ces conditions, la spécificité de ces gènes pour la rhabdomyolyse peut être remise en question. Par exemple, ces gènes pouvaient être retrouvés dans les mêmes proportions pour d'autres maladies inflammatoires telles que des abcès profonds, des arthrites, des endocardites, des hépatites... Ainsi, la pertinence de ces gènes pour la rhabdomyolyse à l'effort serait moins certaine. En l'absence d'études comparatives avec d'autres maladies, il est difficile de tirer des conclusions définitives sur la prédisposition à la rhabdomyolyse chez les chevaux porteurs de ces gènes. Un des moyens de trouver un gène spécifique responsable de la rhabdomyolyse à l'effort serait de screener le génome de chevaux atteints d'autres maladies inflammatoires ou le génome de chevaux sollicités à l'effort et qui ne développent pas de rhabdomyolyses. En pratique, il est difficile de proposer des prélèvements musculaires chez des chevaux en préparation pour les courses sans s'exposer au refus des entraîneurs. De ce fait, nos prélèvements ont été difficiles à standardiser face au nombre restreint de cas. Une autre solution aurait été de prélever les chevaux pathologiques en période de repos et sans symptômes cliniques.

De plus, il s'agit d'une étude partielle du génome équin. Les puces ADN utilisées ne couvrent effectivement pas la totalité du génome équin. Le génome entier du cheval est maintenant découvert, il reste donc à créer une puce équine complète pour étudier le génome en entier.

3.2.2. Confrontation avec la littérature

L'origine des lésions musculaires peut être métabolique ou mécanique. La présence excessive de calcium intracellulaire liée à l'activation de la phospholipase A (origine métabolique) entraîne une cascade de réactions biochimiques dont certains points restent à élucider. De plus, la rupture de fibres musculaires (origine mécanique) est fréquemment imputée à la trop grande traction exercée sur les fibres.

3.2.2.1 Troubles calciques à l'origine de rhabdomyolyse ?

Une rhabdomyolyse est une destruction de la cellule musculaire squelettique qui peut être soit primitive soit plus fréquemment secondaire. L'augmentation de la concentration en calcium libre intracellulaire semble être le mécanisme central de cette pathologie. En humaine, une étude a été réalisée pour étudier les mécanismes physiopathologiques des rhabdomyolyses secondaires et mettre en place de nouvelles conduites diagnostiques grâce à de multiples approches (Guis *et al.*, 2005) : métabolique, histoenzymologique et génétique. Les explorations métaboliques par spectrométrie de résonance magnétique ont montré une dérégulation de l'homéostasie du pH vraisemblablement responsable d'un phénomène en cascade, conduisant à la rupture de l'homéostasie calcique. Les rhabdomyolyses secondaires aux hypocholestérolémiants (type statines) ont aussi été étudiées (Guis *et al.*, 2003). Les premières explorations par des tests de contracture in vitro (réalisés sur des lambeaux musculaires) ont mis en évidence une rupture de l'homéostasie calcique. Un traitement à base de statines pourrait démasquer le déficit (probablement d'origine génétique) d'un canal calcique chez certains patients.

De plus, bien que rare (1/100 000 anesthésies), l'hyperthermie maligne humaine (HM) est un véritable modèle expérimental pharmacologique de rhabdomyolyse chez l'homme. Le syndrome HM est un état d'hypercatabolisme paroxystique des muscles striés, induit par certains agents anesthésiques (halogénés et succinylcholine) chez des sujets apparemment en bonne santé, atteints de myopathie infraclinique génétiquement déterminée. Une des anomalies génétiques responsables du syndrome HM a été localisée sur le chromosome 19 (Locus g^{1-13}) proche de celui codant le récepteur à la ryanodine (MacLennan *et al.*, 1990). Cette protéine, couplée au canal calcique du réticulum sarcoplasmique, est responsable de la libération de calcium libre intramyoplasmique. Dans le muscle HM, une anomalie de structure du canal réticulaire et/ou récepteur à la ryanodine serait le principal responsable d'une augmentation considérable du taux de calcium libre intramyoplasmique perpétuant l'ensemble des réactions métaboliques conduisant à la contracture musculaire avec production de chaleur. Le phénotype HM est déterminé chez un patient suspect d'une HM au cours d'une anesthésie ou un membre consanguin de sa famille, par l'investigation directe d'un fragment musculaire prélevé chirurgicalement et soumis à des concentrations croissantes d'halothane et de caféine (Adnet *et al.*, 1993). Un muscle sensible à l'HM a une contracture anormale lors de l'exposition à l'halothane et un seuil de contracture caféinique plus bas que le muscle normal.

3.2.2.2 Troubles mécaniques à l'origine de rhabdomyolyse ?

L'exercice intense entraîne des microlésions musculaires. Leur gravité et leur évolution sont variables, dépendant de la durée et du type d'effort (Bigard, 2001). L'importance des lésions peut être évaluée à partir de marqueurs plasmatiques plus ou moins spécifiques comme la créatine kinase. L'augmentation de l'activité CK ou de la concentration de MDA dans le plasma ne peut au mieux refléter qu'un état de surcharge mécanique du muscle. Cependant, les conséquences de ces lésions sur l'immunité peuvent s'intégrer dans le cadre clinique de surentraînement (Bigard, 2001).

3.2.2.3 Gènes candidats responsables de rhabdomyolyse

Le gène APP est un des 20 gènes les plus significatifs. En humaine, il a été découvert (Fidzianska et Glinka, 2006) que les bêta amyloïdes et les protéines tau seraient impliqués dans la formation de myosites à inclusion cellulaire (IBM). Après des biopsies réalisées sur 4 enfants et un adolescent atteints d'une myopathie congénitale à inclusion IBM-like, des inclusions bêta amyloïdes et protéine tau ont été mises en évidence. Cette pathologie musculaire pourrait donc être liée à une mutation du gène APP entraînant ainsi des protéines d'agrégations anormales.

En outre, le gène CD36, lui aussi significatif, est impliqué dans la réponse inflammatoire aux bêta-amyloïdes à l'origine de la formation d'IBM (Salajegheh *et al.*, 2007).

Une étude a été réalisée chez l'homme en utilisant de la même façon des puces ADN (Mahoney *et al.*, 2008). Quatre hommes ont été biopsés à t0+3h et t0+48h suite à l'achèvement de 300 contractions excentriques (=t0). A t0+3h, 113 gènes étaient sur exprimés et 34 gènes sous exprimés. A t0+48h, 59 gènes étaient sur exprimés et 29 sous exprimés. 19 gènes modifiés ont été choisis et ont conduit à des analyses secondaires de RT-PCR. Cette deuxième analyse a confirmé l'augmentation de SREBP-2 (augmentation de la protéine et du gène). L'expression du récepteur IL1, régulateur de SREBP-2, est également élevée après exercice. Ainsi, on peut déduire une modification de la synthèse du cholestérol et des lipides. De la même façon, l'expression de la protéine kinase H1, la protéine Z alpha et la protéine 1 ankryin est impliquée dans la croissance musculaire. L'utilisation des puces ADN combinée avec la RT-PCR a permis d'identifier des gènes répondant à la souffrance musculaire.

CONCLUSION

La rhabdomyolyse à l'effort est une inflammation des fibres musculaires et se traduit par l'augmentation anormale des enzymes musculaires (CK, AST...). Cette maladie met en cause différentes voies métaboliques et notamment :

- la voie anaérobie qui peut aboutir à une acidose lactique ;
- un défaut de régulation du calcium intracellulaire ;
- une anomalie de stockage du glycogène ;
- des troubles de la chaîne respiratoire mitochondriale ;
- des troubles thyroïdiens ;
- une influence du cycle oestral.

Son expression clinique est variable et son origine reste encore mystérieuse ; cependant une prédisposition génétique a été démontrée.

Cette étude avait donc pour but de mettre en évidence les gènes impliqués dans la rhabdomyolyse.

Des biopsies des muscles fessier moyen et longissimus dorsi ont été réalisées chez des Trotteurs Français atteints de rhabdomyolyse à l'effort et des témoins. Après extraction d'ARN et transcription reverse, de l'ADNc équin a été hybridé avec de l'ADN souris et équin. L'hybridation des puces avec de l'ADNc fluoré a permis d'identifier la surexpression de certains gènes chez les chevaux malades comparés aux chevaux sains.

La puce oligo-équine partielle a été utilisée de façon pionnière pour étudier l'inflammation et le métabolisme musculaire chez le cheval.

Cette étude est la première qui utilise une puce équine pour mettre en évidence une sur ou sous expression génétique dans une pathologie équine. Elle montre que l'expression génétique des rhabdomyolyses à l'effort est très différente de celle d'un cheval au repos : 159 gènes sont significativement modifiés. La spécificité de ces gènes dans la rhabdomyolyse reste à démontrer en particulier en comparant avec d'autres maladies inflammatoires.

Chez le cheval, les puces ADN peuvent donc être utilisées pour analyser les gènes responsables d'anomalies métaboliques du muscle (maladie) ou d'une modification due au dopage.

Dans le futur, les puces pourraient-permettre de développer des kits de diagnostic pour la mise en évidence et la caractérisation de gènes impliqués dans des affections d'origine génétique : comparaisons multigéniques, détection de mutation ou délétion, mise en évidence de poly-morphismes, puces de reséquençage...(www.alliance-maladies-rares.org/IMG/pdf/maladies_rares2008.pdf)

Finalemment, un programme de sélection génétique adéquat pourrait diminuer le nombre de chevaux victimes de l'une ou l'autre des causes de rhabdomyolyse d'effort récidivante.

Annexe 1 : Protocole d'un examen clinique d'un cheval malade



CLINIQUE VETERINAIRE DE GROSBOS

Domaine de Grosbois
94470 BOISSY SAINT LEGER

tél. : 33 (0) 1 45 69 65 39 - Fax : 33 (0) 1 45 69 00 10

Richard CORDE
Docteur Vétérinaire
N° Ordre 8357

Valérie DENIAU
Docteur Vétérinaire
N° Ordre 14612

Noeltje HEILIGERS-CURENS
Docteur Vétérinaire
N° Ordre 12854

Fabrice ROSSIGNOL
Docteur Vétérinaire
N° Ordre 13460

EXAMEN MYOSITE

Cheval : VAUSICA		Propriétaire : Bromer D.		Date : 12/6/05	
H-M-Race : TF		Age : 4 ans		Heure : 11.00	
Alimentation :				Litière : Paille	
Temps écoulé depuis les premiers symptômes : 1/2 heure -					
Commémoratifs : Raideur pendant la promenade → rentrée - depuis 4 - bloquée + sueur + agitation					
EXAMEN CLINIQUE			EXAMENS COMPLEMENTAIRES		
FC	48	Soulevé membres postérieurs		Prise de sang : CPK, SGOT	CK 7200
Muqueuses	N	Palpation du dos	Raide +	Biopsies musculaires	
Sudation	+				
Diagnostic : Myosite aiguë modérée Pronostic : Plutôt favorable					
Traitement :			Perfusion en IV :		
Vétranquil 2ml iM			-10L Ringer Lactate + DMSO si modéré		
Dimazon 10ml IV			-En continu si majeur		
Butorphenol			Saignée		
Méflosyl 10ml IV					
Consignes :					
- un repas de foin					
- une bonne litière					
SUIVI MEDICAL du lendemain:					
Prise de sang : CPK, urée, créatine			Vit E, sélénium 2 fois par jour 15g.		
			Phytorenal matin et soir 30ml 15g		
Consignes :					
- renouveler prise de sang à 8 et 15 jours					
- promenades au pas tant que SGOT > 800 UI/mL, sous Vétranquil si nécessaire					
- reprise du travail avec contrôle des CPK avant et 3h après le travail					
- traitement terminé lorsqu'il n'y a plus d'augmentation des CPK pendant le travail					
- si aucune cause évidente, conseiller un bilan orthopédique.					

Remarque :

Annexe 2 : Exemple de compte rendu de l'analyse de sang d'un cheval témoin

LABORATOIRE DEPARTEMENTAL FRANK DUNCOMBE

14053 CAEN CEDEX 4 (Adresse postale)

1, Route de Rosel, SAINT-CONTEST

Département SANTE ANIMALE

Téléphone : 02-31-47-19-19

Fax : 02-31-47-19-49 Immuno-Hémato-Biochimie-Virologie

Ouverture du lundi au vendredi 8h30 à 12h30 de 13h30 à 17h30
le samedi matin de 08h30 à 12h00

Fax : 02-31-47-19-42 Autopsie-Bactériologie-Parasitologie

Le rapport d'analyse ne concerne que le(s) produit(s) soumis à analyse

MONSIEUR BARREY ERIC
CONTRAT ATIGE CR 53391
BATIMENT DES SCIENCES
BOULEVARD FRANCOIS MITTERAND
91025 EVRY CEDEX

MONSIEUR BARREY ERIC
DOCTEUR VETERINAIRE
UNIVERSITE D'EVRY - LIGE
BOULEVARD FRANCOIS MITTERAND
91025 EVRY CEDEX

Référence du prélèvement

Identification de l'animal	MAYA	N° de l'animal	
Espèce	Equine	Sexe	
Race		Age	
Date de prélèvement	24/03/2005	N° échantillon	S.2005.11862-3-1
Date de réception au laboratoire	25/03/2005 09:00	Nature d'échantillon	Sang
Date de début d'analyse	25/03/2005		

HEMATOLOGIE

Numération Formule

Identification de l'animal

MAYA

Numération Globulaire

Hématies (/ mm ³)	6 880 000	Taux globulaire moyen (picog.)	16.28
Leucocytes (/ mm ³)	5 520	Volume globulaire moyen (μ ³)	42.44
Hémoglobine (g /100 ml) :	11.2	Rapport erythro-leucocytaire	1.25
Hématocrite (%)	29.2	Rapport hématocrite / hémoglobine	2.61
		Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (%) :	38.36

Formule sanguine

	Résultats en %	Résultats en valeur absolue par mm ³
Polynucléaires neutrophiles	50.8	2 804
Polynucléaires éosinophiles	3.9	215
Polynucléaires basophiles	2.6	144
Monocytes	4.3	237
Grands lymphocytes	0.9	50
Petits lymphocytes	37.6	2 076
Anomalies des hématies	Néant	
Anomalies des leucocytes	Néant	

Numération des Plaquettes

Résultat (/ mm ³)	62 000
-------------------------------------	--------

BIOCHIMIE

RAPPORT D'ANALYSE N° : S.2005.11862-3

Saisie du : 25/03/2005
Demande N° : S.2005.11862

Page 1/2

LABORATOIRE DEPARTEMENTAL FRANK DUNCOMBE

14053 CAEN CEDEX 4 (Adresse postale)

1, Route de Rosel, SAINT-CONTEST

Département **SANTE ANIMALE**

Téléphone : 02-31-47-19-19 Fax : 02-31-47-19-49 Immuno-Hémato-Biochimie-Virologie
Ouverture du lundi au vendredi 8h30 à 12h30 de 13h30 à 17h30 Fax : 02-31-47-19-42 Autopsie-Bactériologie-Parasitologie
le samedi matin de 08h30 à 12h00

Le rapport d'analyse ne concerne que le(s) produit(s) soumis à analyse

Animal	Nature	Analyses	Résultats	Unités
MAYA	Sang	Créatine phosphokinase Transaminase GOT / ASAT	289 (1) 199	UI / l 30°C UI / l 30°C

Observations éventuelles : (1) Résultat soumis à un contrôle

Le Responsable Technique - Saint-Contest le : 25/03/2005

La signature d'une personne par service concerné atteste de la validité du rapport d'analyse.

Guillaume FORTIER
Docteur Vétérinaire

Stéphane PRONOST
Biologiste

Karine MAILLARD
Docteur Vétérinaire

Christel MARCILLAUD-PITEL
Docteur Vétérinaire

Pierre-Hugues PITEL
Docteur Vétérinaire

RAPPORT D'ANALYSE N° : S.2005.11862-3

Saisie du : 25/03/2005
Demande N° : S.2005.11862

Page 2/2

Annexe 3 : Protocole de biopsies musculaires

Matériel utilisé :

Les produits : Vétédine® savon, Vétédine® solution, Calmivet®, Lurocaïne®, Rompun® 5%, de l'alcool et de l'eau

Les ustensiles : matériel de contention pour le cheval (licol + longe), brosses de pansage, gants, aiguilles (roses), seringues (de 5cc), mètre ruban, paire de ciseaux pour couper les poils, un sceau, éponges stériles de chirurgie, compresses, lames de scalpel n°15, aiguilles à biopsies stériles (prévoir des aiguilles en plus), un pistolet à biopsie, tubes à prélèvement + 0.5 mL RNA lätter (tubes pesés) avec un porte tube et feutre indélébile

Règle d'or : Travailler propre et vite !

Check liste du matériel

Pansage : étrille, bouchon...

Tranquillisation : 2cc de Calmivet® en IV stricte

Repérage :

1/3 de la distance tuber sacral (le point le plus haut)/tuber coxae (le plus crânio-dorsal)

1/3 de la distance tuber coxae (le plus ventral : le point le plus saillant de la hanche)/espace intervertébrale Cd1-Cd2 (à la base de la queue)

Mesurer avec un mètre souple: dorsalement marquer en dessous du mètre (environ à 32cm) et ventralement au-dessus (environ à 52cm) à l'aide d'une paire de ciseaux

De 25 à 30cm du tuber sacral crânialement et 5 à 7cm de la colonne vertébrale

Nettoyage : 3 lavages avec de la Vétédine savon et de l'eau

Sédation : 5 à 6cc de Rompum 5% en IV stricte

Anesthésie locale : 2,5cc de Lurocaïne en SC sur chaque point en remontant progressivement jusqu'à former une petite boule. Frictionner pour bien faire diffuser le produit. Patienter 5 min

Incision cutanée perpendiculaire à la peau assez large avec un scalpel n°15 (environ 4mm)

Préparation des tubes avec un conservateur et de la pince pour manipuler les biopsies proprement

Prélèvement musculaire : Installer l'aiguille stérile dans le pistolet préalablement nettoyé à l'alcool

Charger à deux reprises le pistolet puis le mettre en position F

Enfoncer l'aiguille à 3,5cm de profondeur pour les prélèvements du fessier moyen et 2,5cm de profondeur pour le muscle longissimus

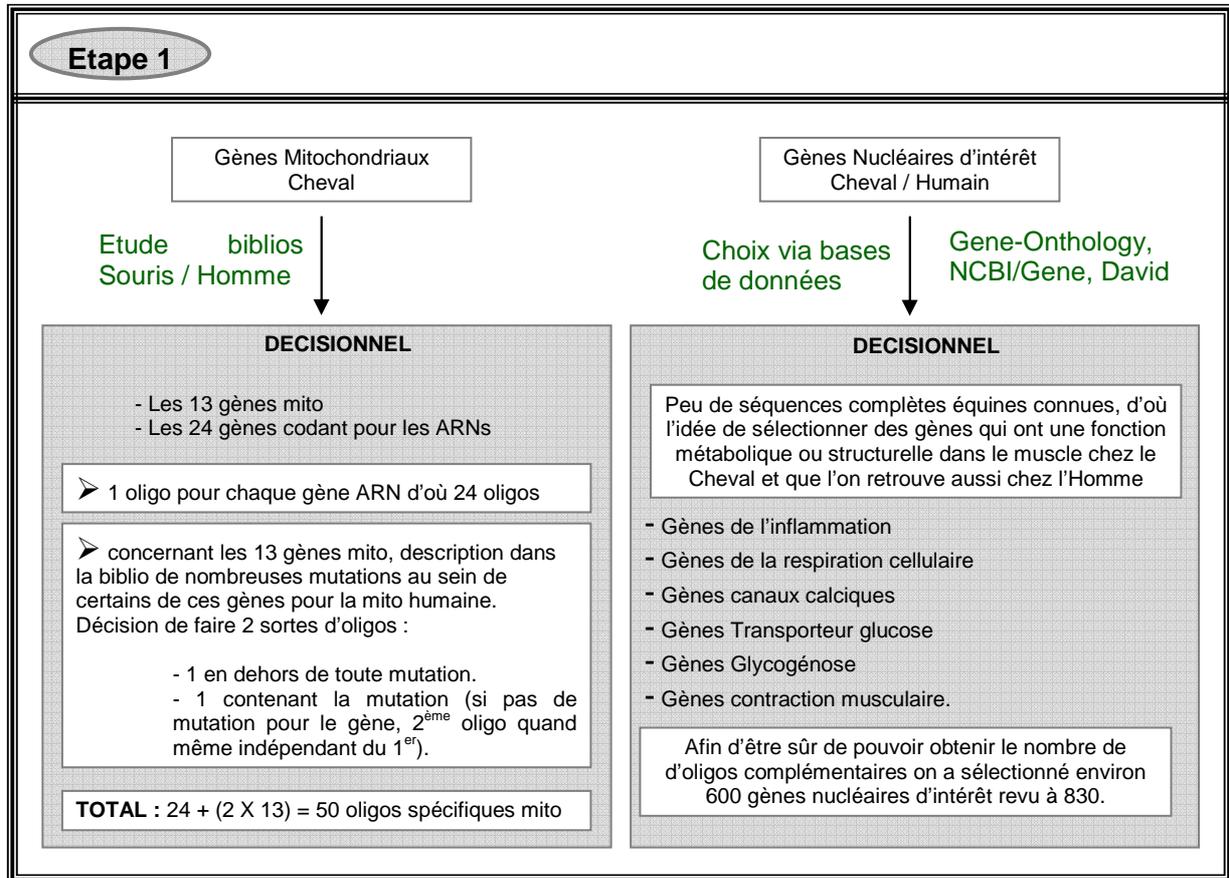
Déclencher le pistolet

Recueillir l'échantillon de muscle dans un tube à ARN

Identifier l'échantillon : cheval+n°+muscle+position+date

Exemple: Glove I GM D1 20050221

Annexe 4 : Processus de conception de la puce oligo équine



Etape 2

- Lecture de la biblio « puce ADN et oligos » souris et humaine.
- Discussions avec équipe « microarrays » du CEA.

Sélection et définition des paramètres retenus pour la construction des oligos

- taille de l'oligo.
- distance de la 3'Tail.
- pourcentage de GC / TM

✓ Taille de l'oligo :

Dans la littérature, pour ce type de puce, on trouve toute sorte de taille pour les oligos utilisés. Comme nous allons travailler sur une des puces RNG décision est prise d'utiliser leurs préconisations, à savoir 50 nucléotides. De plus l'oligo doit être modifié en NH₂ par ajout d'un groupe aminé.

✓ Distance en 3' Tail :

Il est préférable de choisir les oligos le plus près de la queue 3' du gène concerné, pour limiter les problèmes d'hybridation.

✓ Pourcentage GC / TM :

Le pourcentage de GC influe sur la thermodynamique (agitation moléculaire). Un certain pourcentage favorise la stabilité de l'hybridation

Etape 3

Construction des oligos 1 « gènes mito normaux » et des 24 oligos ARN

Gènes Mito Equin Normaux

↓
Séquence complète connue

↓
Sélection des 50 derniers nucléotides via outil excel

↓
Oligo 1

Construction des oligos 2 « gènes mito mutés » ou oligos 2 normaux

Séquence complète du gène

↙
Pas de mutation

↓
Sélection de 50 nucléotides différents de oligo1 via outil excel

↓
Oligo 2

↘
Mutations répertoriées chez l'Homme

↓
Identification du ou des nucléotides mutés chez l'Homme

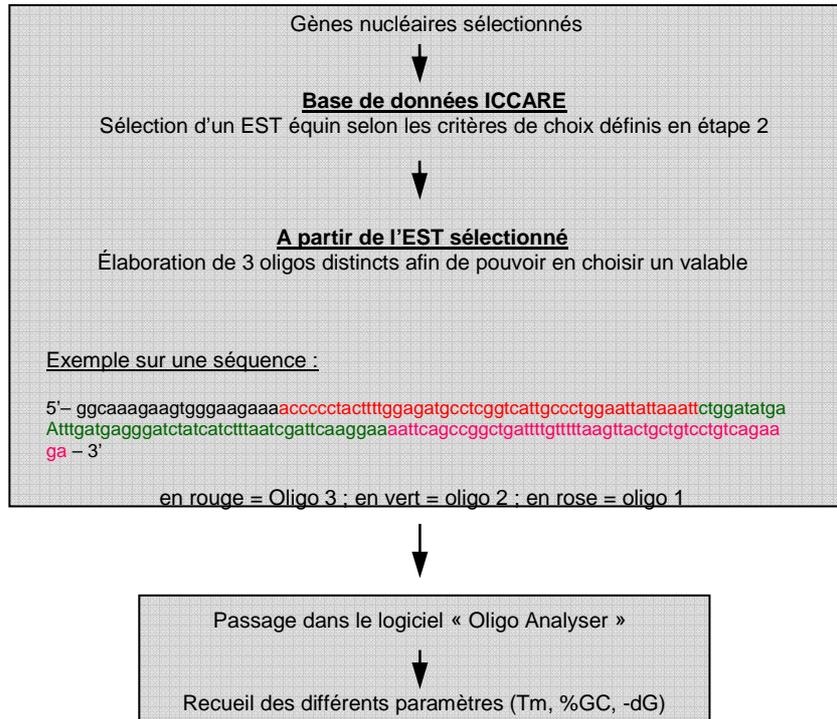
↓
Report et annotation de la mutation sur la séquence Cheval via Blast

↓
Sélection d'une séquence équine de 50 bases autour de la mutation annotée

↙ ↘
Passage dans le logiciel « Oligo Analyser »

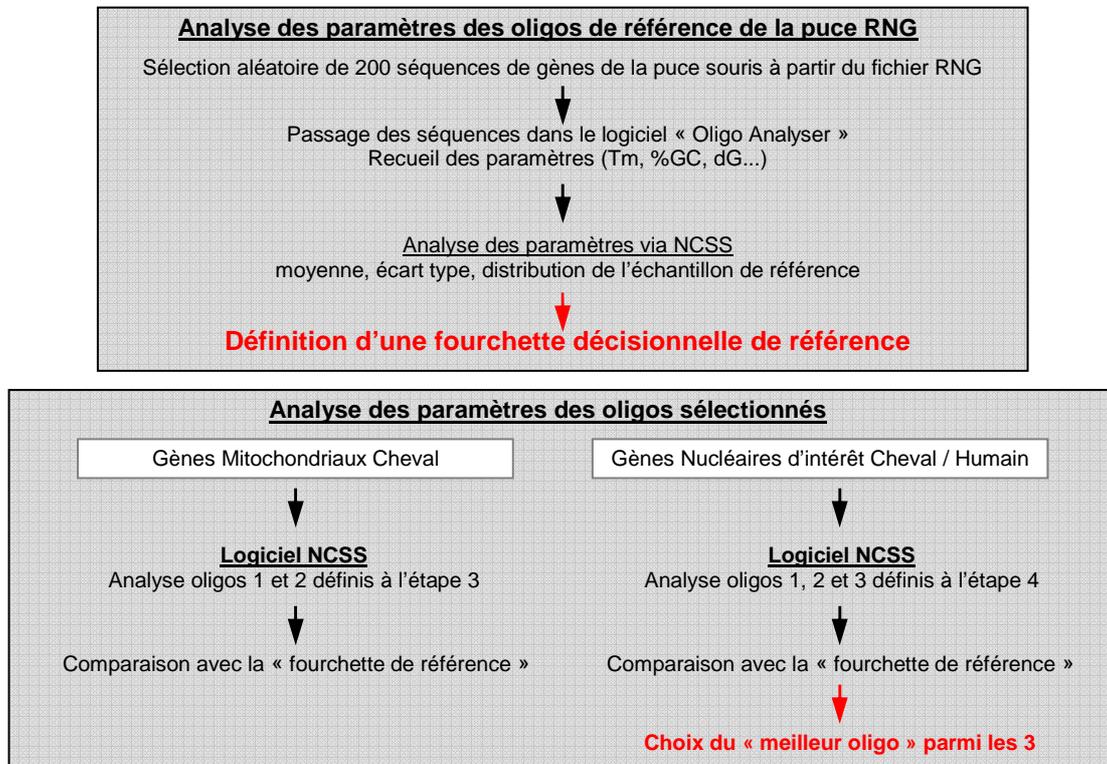
↓
Recueil des différents paramètres (T_m, %GC, -dG)

Etape 4



Etape 5

Statistiques descriptives



BIBLIOGRAPHIE

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], Diagram of the mammalian mitochondrion showing the relationship between energy production, ROS generation, and regulation of apoptosis [http://www.mitomap.org/MITOMAP/mito_apop.pdf]. (consulté le 22 Août 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], Glycolyse [<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Metabo/glyco1.html#>]. (consulté le 13 Mai 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], [http://www.favv-afsc.fgov.be/sp/sa-myo-atypique/myo-atypique_fr.asp]. (consulté le 22 Août 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], [http://www.medicine.flammarion.com/nl/21/pdf/Appareils_24Chap.pdf]. (consulté le 15 Juin 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], [www.alliance-maladies-rares.org/IMG/pdf/maladies_rares2008.pdf]. (consulté le 14 Juin 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], [www.cvm.umn.edu/umec/lab/RER_new.html]. (consulté le 15 Juin 2008)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], [http://www.med.univrennes1.fr/wkf/stock/RENNES20061026025319cbendavico_ours_UE1_Claude_bendavid.pdf]. (consulté le 1 Janvier 2009)

Anonyme *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], NCBI/Gene, banque de gènes comprenant la structure du gène, sa localisation chromosomique, les différents ARNm, les accession numbers, les identifiants GO, un résumé sur le gène et le rôle de la protéine, les homologues et orthologues, un peu de bibliographie, des liens avec Unigene, OMIM, Protein [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>]. (consulté le 2 Mai 2009)

Adjaye J., Herwig R., Herrmann D., Wruck W., Benkahla A., Brink T. C., Nowak M., Carnwath J. W., Hultschig C., Niemann H. & Lehrach H. (2004) "Cross-species hybridisation of human and bovine orthologous genes on high density cDNA microarrays", *BMC.Genomics*, **5**, no. 1, p. 83.

Adnet P. J., Bromberg N. L., Haudecoeur G., Krivosic I., Adamantidis M. M., Reyford H., Bello N. & Krivosic Horber R. M. (1993) "Fiber-type caffeine sensitivities in skinned muscle fibers from humans susceptible to malignant hyperthermia", *Anesthesiology*, **78**, no. 1, pp. 168-177.

Aleman M. (2008) "A review of equine muscle disorders", *Neuromuscul.Disord.*, **18**, no. 4, pp. 277-287.

Art T, Amory H & Lekeux P. (2000) "Affections musculaires et intolérance à l'effort.". *Pratique vétérinaire équine*, **32**, pp. 305-309

Barbe C (2004) Les rhabdomyolyses à l'exercice chez le cheval dites "myopathies" à l'exercice. Etude bibliographique. Thés Doct. Vét. Nantes. 113 pages.

Barrey E. (1994) "Propriétés contractiles de fibres musculaires et performance physique chez le cheval", *INRA Prod.Anim.*, **7**, no. 1, pp. 41-53.

Barrey E., Mucher E., Maltere P., Amiot F. & Gidrol X. (2005) "Expression profiling in blood cell exercising horse using mouse and human cDNA microarrays", *Dorothy Russel Havemeyer Foundation, Inc. 6th International Equine Gene Mapping Workshop 6*

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**, pp. 43-49.

Barrey E., Valette J. P., Jouglin M., Blouin C. & Langlois B. (1999), "Heritability of percentage of fast myosin heavy chains in skeletal muscles and relationship with performance", *Equine Vet.J.Suppl*, **30**, pp. 289-292.

Beech J. (1997) "Chronic exertional rhabdomyolysis", *Vet.Clin.North Am.Equine Pract.*, **13**, no. 1, pp. 145-168.

Beech J., Lindborg S., Fletcher J. E., Lizzo F., Tripolitis L. & Braund K. (1993) "Caffeine contractures, twitch characteristics and the threshold for Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in skeletal muscle from horses with chronic intermittent rhabdomyolysis", *Res.Vet.Sci.*, **54**, no. 1, pp. 110-117.

Benchaouir R, Rameau P, Decraene C, Dreyfus P.; Israeli D.; Pietu G.; Danos O. & Garcia L. (2004) "Evidence for a resident subset of cells with SP phenotype in the C2C12 myogenic line: a tool to explore muscle stem cell biology" *Exp Cell Res*, **294**, pp. 254-268.

Bigard A.X. (2001) "Lésions musculaires induites par l'exercice et surentraînement", *Science & Sports*, **16**, pp. 204-215.

Cartegni L., Hastings M. L., Calarco J. A., de Stanchina E. & Krainer A. R. (2006) "Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2", *Am.J.Hum.Genet.*, **78**, no. 1, pp. 63-77.

Chismar J. D., Mondala T., Fox H. S., Roberts E., Langford D., Masliah E., Salomon D. R. & Head S. R. (2002) "Analysis of result variability from high-density oligonucleotide arrays comparing same-species and cross-species hybridizations", *Biotechniques*, **33**, no. 3, pp. 516-8, 520, 522.

Chowdhary B. P. & Raudsepp T. (2008), "The horse genome derby: racing from map to whole genome sequence", *Chromosome.Res.*, **16**, no. 1, pp. 109-127.

Chowdhary B. P., Raudsepp T., Kata S. R., Goh G., Millon L. V., Allan V., Piumi F., Guerin G., Swinburne J., Binns M., Lear T. L., Mickelson J., Murray J., Antczak D. F., Womack J. E. & Skow L. C. (2003) "The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in human and mouse genomes", *Genome Res.*, **13**, no. 4, pp. 742-751.

Chung C. H., Bernard P. S. & Perou C. M. (2002) "Molecular portraits and the family tree of cancer", *Nat.Genet.*, **32** Suppl, pp. 533-540.

Clarke N. F. & Guicheney P. (2008) "Consanguineous families with congenital muscular dystrophy: towards identification of new genes.", *158th ENMC workshop on Congenital Muscular dystrophy*, pp. 103.

Collinder E., Lindholm A. & Rasmuson M. (1997) "Genetic markers in standardbred trotters susceptible to the rhabdomyolysis syndrome", *Equine Vet.J.*, **29**, no. 2, pp. 117-120.

Cotrel C. 2004, Analyse de la typologie musculaire du cheval trotteur français. Thèse Doct. Vét. Alfort. 66 pages.

Crimi M., Bordoni A., Menozzi G., Riva L., Fortunato F., Galbiati S., Del Bo R., Pozzoli U., Bresolin N., & Comi G. P. (2005) "Skeletal muscle gene expression profiling in mitochondrial disorders", *FASEB J.*, **19**, no. 7, pp. 866-868.

Dranchak P. K.; Valberg S. J.; Onan G. W.; Gallant E. M.; Binns M. M.; Swinburne J. E. & Mickelson J. R. (2006) "Exclusion of linkage of the RYR1, CACNA1S, and ATP2A1 genes to recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds.", *Am J Vet Res*; **67**, pp 1395-400.

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.*, **227**, no. 5, pp. 762-767.

Fidzianska A. & Glinka Z. (2006) "Rimmed vacuoles with beta-amyloid and tau protein deposits in the muscle of children with hereditary myopathy", *Acta Neuropathol.*, **112**, no. 2, pp. 185-193.

Finno C. J., Spier S. J. & Valberg S. J. (2008) "Equine diseases caused by known genetic mutations", *Vet.J.*, **179**, pp 336-47.

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**, no. 10, pp. 1319-1327.

Frazer K. A., Elnitski L., Church D. M., Dubchak I. & Hardison R. C. (2003) "Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources", *Genome Res.*, **13**, no. 1, pp. 1-12.

Freestone J. F., Gossett K., Carlson G. P. & Church G. (1991) "Exercise induced alterations in the serum muscle enzymes, erythrocyte potassium and plasma constituents following feed withdrawal or furosemide and sodium bicarbonate administration in the horse", *J.Vet.Intern.Med.*, **5**, no. 1, pp. 40-46.

Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V. K., Weiler J. E., O'Brien P. J. & MacLennan D. H. (1991) "Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia", *Science*, **253**, no. 5018, pp. 448-451.

Girke T., Todd J., Ruuska S., White J., Benning C. & Ohlrogge J. (2000) "Microarray analysis of developing Arabidopsis seeds", *Plant Physiol*, **124**, no. 4, pp. 1570-1581.

Gottlieb M., Essen-Gustavsson B., Lindholm A. & Persson S. G. (1989) "Effects of a draft-loaded interval-training program on skeletal muscle in the horse", *J. Appl. Physiol.*, **67**, pp. 570-577

Gu W. & Bertone A. L. (2004) "Generation and performance of an equine-specific large-scale gene expression microarray", *Am.J.Vet.Res.*, **65**, no. 12, pp. 1664-1673.

Guis S., Bendahan D., Kozak-Ribbens G., Figarella-Branger D., Mattei J. P., Pellissier J. F., Treffouret S., Bernard V., Lando A. & Cozzone P. J. (2003) "Rhabdomyolysis and myalgia associated with anticholesterolemic treatment as potential signs of malignant hyperthermia susceptibility", *Arthritis Rheum.*, **49**, no. 2, pp. 237-238.

Guis S., Mattei J. P., Cozzone P. J. & Bendahan D. (2005) "Pathophysiology and clinical presentations of rhabdomyolysis", *Joint Bone Spine*, **72**, no. 5, pp. 382-391.

Harris P. A. (1990) "An outbreak of the equine rhabdomyolysis syndrome in a racing yard", *Vet.Rec.*, **127**, no. 19, pp. 468-470.

Harris P. A. (1991) "The equine rhabdomyolysis syndrome in the United Kingdom: epidemiological and clinical descriptive information", *Br.Vet.J.*, **147**, no. 4, pp. 373-384.

Hoffman E. P., DuBois D. C., Hoffman R. I. & Almon R. R. (2003) "Expression profiling and pharmacogenomics of muscle and muscle disease", *Curr.Opin.Pharmacol.*, **3**, no. 3, pp. 309-316.

Jeansoule N. (2006) *Conception et analyse bio-informatique d'une puce oligonucléotidiques d'ADN équine*. Mémoire de recherche présenté pour l'obtention du Mastère II Spécialisé en Bio-informatique - MSBI et du Mastère II Informatique et Mathématique pour la Biologie Intégrative - IMBI

Kane M. D., Jatcoe T. A., Stumpf C. R., Lu J.; Thomas J.D. & Madore S.J. (2000) "Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays", *Nucleic Acids Res.*, **28**, pp.4552-4557.

Kargul G. J., Dudekula D. B., Qian Y., Lim M. K., Jaradat S. A., Tanaka T. S., Carter M. G. & Ko M. S. (2001) "Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set", *Nat.Genet.*, **28**, no. 1, pp. 17-18.

Kenneth W.Hinchcliff, Andris J.Kaneps & Raymond J.Geor. (2004) "Equine Sports Medicine and Surgery: Basic and Clinical Sciences of the Equine Athlete", *W.B. Saunders Company*, pp. 368.

Landry P., *Références bibliographiques (Documents sur support électronique)*. [en ligne], Le tying-up [<http://www.agrireseau.qc.ca/cheval/documents/seminairepascal%20mod.pdf>.], (consulté le 6 Juin 2008)

Le Brigand K., Russell R., Moreilhon C., Rouillard J. M., Jost B., Amiot F., Magnone V., Bole-Feysot C., Rostagno P., Virolle V., Defamie V., Dessen P., Williams G., Lyons P., Rios G., Mari B., Gulari E., Kastner P., Gidrol X., Freeman T. C. & Barbry P. (2006) "An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes", *Nucleic Acids Res.*, **34**, no. 12, p. e87.

Lentz L. R., Valberg S. J., Balog E. M. Mickelson J. R. & Gallant E. M. (1999) "Abnormal regulation of muscle contraction in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis", *Am.J.Vet.Res.*, **60**, no. 8, pp. 992-999.

Lindholm A. & Piehl K. (1974) "Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of standardbred horses", *Acta Vet.Scand.*, **15**, no. 3, pp. 287-309.

MacLeay J. M., Sorum S. A., Valberg S. J., Mars W. E. & Sorum M. D. (1999a) "Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds", *Am.J.Vet.Res.*, **60**, no. 12, pp. 1562-1566.

MacLeay J. M., Valberg S. J., Sorum S. A., Sorum M. D., Kassube T., Santschi E. M., Mickelson J. R. & Geyer C. J. (1999b) "Heritability of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses", *Am.J.Vet.Res.*, **60**, no. 2, pp. 250-256.

MacLennan D. H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R. G., Frodis W., Britt B. A. & Worton R. G. (1990) "Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia", *Nature*, **343**, no. 6258, pp. 559-561.

Mahoney D. J., Safdar A., Parise G., Melov S., Fu M., MacNeil L., Kaczor J., Payne E. T. & Tarnopolsky M. A. (2008) "Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise", *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, **294**, no. 6, p. R1901-R1910.

Makalowski W., Zhang J. & Boguski M. S. (1996) "Comparative analysis of 1196 orthologous mouse and human full-length mRNA and protein sequences", *Genome Res.*, **6**, no. 9, pp. 846-857.

- Manley S. V., Kelly A. B. & Hodgson D. (1983) "Malignant hyperthermia-like reactions in three anesthetized horses", *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **183**, no. 1, pp. 85-89.
- McLeod J.N. (2005) "Equine articular cartilage microarray", *Plant and Animal Genome XIII Conference 13, W092., Proceed. Equine session. San Diego. 1901*.
- McCue M. E., Valberg S. J., Miller M. B., Wade C., DiMauro S., Akman H. O. & Mickelson J. R. (2008) "Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis", *Genomics*, **91**, no. 5, pp. 458-466.
- Milenkovic D., Oustry-Vaiman A., Lear T. L., Billault A., Mariat D., Piumi F., Schibler L., Crihiu E. & Guerin, G. (2002) "Cytogenetic localization of 136 genes in the horse: comparative mapping with the human genome", *Mamm.Genome*, **13**, no. 9, pp. 524-534.
- Mlekoday J. A., Mickelson J. R., Valberg S. J., Horton J. H., Gallant E. M. & Thompson L. V. (2001) "Calcium sensitivity of force production and myofibrillar ATPase activity in muscles from Thoroughbreds with recurrent exertional rhabdomyolysis", *Am.J.Vet.Res.*, **62**, no. 10, pp. 1647-1652.
- Moody D. E., Zou Z. & McIntyre L. (2002), "Cross-species hybridisation of pig RNA to human nylon microarrays", *BMC.Genomics*, **3**, no. 1, p. 27.
- Mucher E., Jayr L., Rossignol F., Amiot F., Gidrol X. & Barrey E. (2006) "Gene expression profiling in equine muscle tissues using mouse cDNA microarrays", *Equine Vet.J.Suppl* no. 36, pp. 359-364.
- Nollet H. & Deprez P. (2005) "Hereditary skeletal muscle diseases in the horse. A review", *Vet.Q.*, **27**, no. 2, pp. 65-75.
- Novoradovskaya N., Whitfield M. L., Basehore L. S., Novoradovsky A., Pesich R., Usary J., Karaca M., Wong W. K., Aprelikova O., Fero M., Perou C.M., Botstein D. & Braman J. (2005) "Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments", *BMC Genomics*, **20**, pp. 1-13.
- Park H. B., Marklund S., Jeon J. T., Mickelson J. R., Valberg S. J., Sandberg K. & Andersson L. (2003) "Molecular characterization and mutational screening of the PRKAG3 gene in the horse", *Cytogenet.Genome Res.*, **102**, no. 1-4, pp. 211-216.
- Quackenbush J. (2002) "Data normalization and transformation", *Nature genetic supplement*, **32**, pp. 496-500.

- Quiroz-Rothe E., Novales M., Aguilera-Tejero E. & Rivero J. L. (2002) "Polysaccharide storage myopathy in the M. longissimus lumborum of showjumpers and dressage horses with back pain", *Equine Vet.J.*, **34**, no. 2, pp. 171-176.
- Rankinen T., Perusse L., Rauramaa R., Rivera M. A., Wolfarth B. & Bouchard C. (2004) "The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2003 update", *Med.Sci.Sports Exerc.*, **36**, no. 9, pp. 1451-1469.
- Rivero J. L., Serrano A. L., Barrey E., Valette J. P. & Jouglin M. (1999) "Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle", *J.Muscle Res.Cell Motil.*, **20**, no. 2, pp. 211-221.
- Rivero J. L., Talmadge R. J. & Edgerton V. R. (1996) "Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training", *Anat.Rec.*, **246**, no. 2, pp. 195-207.
- Roneus B. & Hakkarainen J. (1985) "Vitamin E in serum and skeletal muscle tissue and blood glutathione peroxidase activity from horses with the azoturia-tying-up syndrome", *Acta Vet.Scand.*, **26**, no. 3, pp. 425-427.
- Ryder O. A. (2005) "Conservation genomics: applying whole genome studies to species conservation efforts", *Cytogenet.Genome Res.*, **108**, no. 1-3, pp. 6-15.
- Salajegheh M., Raju R., Schmidt J. & Dalakas M. C. (2007) "Upregulation of thrombospondin-1(TSP-1) and its binding partners, CD36 and CD47, in sporadic inclusion body myositis", *J.Neuroimmunol.*, **187**, no. 1-2, pp. 166-174.
- Skenderi K. P., Kavouras S. A., Anastasiou C. A., Yiannakouris N. & Matalas A. L. (2006) "Exertional Rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race", *Med.Sci.Sports Exerc.*, **38**, no. 6, pp. 1054-1057.
- Snow D. H. & Guy P. S. (1980) "Muscle fibre type composition of a number of limb muscles in different types of horse", *Res.Vet.Sci.*, **28**, no. 2, pp. 137-144.
- Tajsharghi H., Thornell L. E., Darin N., Martinsson T., Kyllerman M., Wahlstrom J. & Oldfors A. (2002) "Myosin heavy chain IIa gene mutation E706K is pathogenic and its expression increases with age", *Neurology*, **58**, no. 5, pp. 780-786.
- Tsoi S. C. Cale J. M., Bird I. M., Ewart V., Brown L. L. & Douglas S. (2003), "Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection", *Mar.Biotechnol.(NY)*, **5**, no. 6, pp. 545-554.

Valberg S., Haggendal J. & Lindholm A. (1993) "Blood chemistry and skeletal muscle metabolic responses to exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis", *Equine Vet.J.*, **25**, no. 1, pp. 17-22.

Valberg S., Jonsson L., Lindholm A. & Holmgren N. (1993) "Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis", *Equine Vet.J.*, **25**, no. 1, pp. 11-16.

Valberg S. J. (1999) "Spinal muscle pathology", *Vet.Clin.North Am.Equine Pract.*, **15**, no. 1, p. 87.

Valberg S. J., Cardinet G. H., Carlson G. P. & DiMauro S. (1992) "Polysaccharide storage myopathy associated with recurrent exertional rhabdomyolysis in horses", *Neuromuscul.Disord.*, **2**, no. 5-6, pp. 351-359.

Valberg S. J., Geyer C., Sorum S. A. & Cardinet G. H. (1996) "Familial basis of exertional rhabdomyolysis in quarter horse-related breeds", *Am.J.Vet.Res.*, **57**, no. 3, pp. 286-290.

Valberg S. J. & Hodgson D. R. (2002) "Diseases of Muscle". Smith B.P. *Large Animal Internal Medicine. Mosby Inc.*, pp. 1266-1291.

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**, pp. 533-538.

Valette J. P., Barrey E., Jouglin M., Courouce A., Auvinet B. & Flaux B. (1999) "Standardisation of muscular biopsy of gluteus medius in French trotters", *Equine Vet.J.Suppl*, **30**, pp. 342-344.

Van den Hoven R., Wensing T., Breukink H. J., Meijer A. E. & Kruip T. A. (1985) "Variation of fiber types in the triceps brachii, longissimus dorsi, gluteus medius, and biceps femoris of horses", *Am.J.Vet.Res.*, **46**, no. 4, pp. 939-941.

Vandenplas M.L., Moore J.N., Hurley D.J., Last L., Grafton M., Seamans S, Sun F., Liang C., Cordonnier-Pratt M. M. & Pratt L. H. (2005) "Equine cDNA Microarrays For Examining Gene Expression Profiles in Pro-Inflammatory Conditions And Other Diseases.", *Plant and Animal Genome XIII Conference, Proceed. Equine session.*

Vladutiu G. D., Bennett M. J., Smail D., Wong L. J., Taggart R. T. & Lindsley H. B. (2000) "A variable myopathy associated with heterozygosity for the R503C mutation in the carnitine palmitoyltransferase II gene", *Mol.Genet.Metab*, **70**, no. 2, pp. 134-141.

Votion D.M. & Serteyn D. (2008) "Equine atypical myopathy : A review" *The Veterinary Journal*, **178**, pp.185-190.

Waldron-Mease E., Klein L. V., Rosenberg H. & Leitch M. (1981) "Malignant hyperthermia in a halothane-anesthetized horse", *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **179**, no. 9, pp. 896-898.

Ward T. L., Valberg S. J., Adelson D. L., Abbey C. A., Binns M. M. & Mickelson J. R. (2004) "Glycogen branching enzyme (GBE1) mutation causing equine glycogen storage disease IV", *Mamm.Genome*, **15**, no. 7, pp. 570-577.

Ward T. L., Valberg S. J., Gallant E. M. & Mickelson J. R. (2000) "Calcium regulation by skeletal muscle membranes of horses with recurrent exertional rhabdomyolysis", *Am.J.Vet.Res.*, **61**, no. 3, pp. 242-247.

Ward T. L., Valberg S. J., Lear T. L., Guerin G., Milenkovic D., Swinburne J. E., Binns M. M., Raudsepp T., Skow L., Chowdhary B. P. & Mickelson J. R. (2003) "Genetic mapping of GBE1 and its association with glycogen storage disease IV in American Quarter horses", *Cytogenet.Genome Res.*, **102**, no. 1-4, pp. 201-206.

Weil S.H. (1982) "Biochimie générale" *Masson Paris*, pp. 470.

Weiss A., McDonough D., Wertman B., Acakpo-Satchivi L., Montgomery K., Kucherlapati R., Leinwand L. & Krauter K. (1999) "Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, no. 6, pp. 2958-2963.

Willoughby D. S. & Nelson M. (2002) "Myosin heavy chain mRNA expression after a single session of heavy resistance exercise". *Medicine and Science in Sports and Exercise*, **34**, no.8, pp.1262-1269.

Zhou X., Dimachkie M. M., Xiong M., Tan F. K. & Arnett F. C. (2004) "cDNA microarrays reveal distinct gene expression clusters in idiopathic inflammatory myopathies", *Med.Sci.Monit.*, **10**, no. 7, pp. 191-197.