

Le microdamier d'expression: un outil performant dans la compréhension de la réponse immunitaire à un stress causé par l'exercice chez le cheval

Revue de littérature

SCHOENECKER J.¹, ART T.², PIROTTIN D.², LEKEUX P.², RAMERY E.²

¹ Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, 4000 Liège, Belgique

² Département des Sciences fonctionnelles, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr E. Ramery E-mail : Eve.Ramery@ulg.ac.be

RESUME : Malgré de multiples études, les interrelations entre l'exercice, le stress et la réponse immune sont peu définies. Or, la compréhension de ces interrelations pourrait jouer un rôle très important dans l'amélioration de la santé et des résultats sportifs des athlètes.

En effet, l'exercice peut être reconnu comme un stress. Il induit des modifications de l'équilibre homéostatique qui peuvent à leur tour altérer la réponse immunitaire de l'hôte et donc sa susceptibilité aux maladies. L'adrénaline est la molécule essentielle de tout processus de stress.

La technologie des microdamiers, outil majeur d'investigation transcriptomique, permet l'étude de l'expression génique de l'ensemble du génome. Son utilisation devrait donc permettre de mieux caractériser et définir les interrelations entre l'exercice, le stress et la réponse immune.

Cette revue recense les interrelations connues entre la réponse immune à un stress adrénérgique d'une part et la réponse immune à l'exercice d'autre part. Elle considère en outre la contribution potentielle des microdamiers à une meilleure compréhension des effets d'un stress, et plus particulièrement celui lié à l'exercice, sur l'immunité.

1. INTRODUCTION

Le stress se définit comme une situation dans laquelle l'organisme réunit plusieurs fonctions pour réagir à une agression, qu'elle soit physique, chimique ou psychologique. Il correspond à un état d'homéostasie menacé. L'activation du système de stress mène à des adaptations du comportement et à des changements physiques et physiologiques (Elenkov et Chrousos, 2007). Chez le cheval, l'augmentation immédiate de la concentration du cortisol dans le sérum après l'exercice, associée à l'augmentation du *ratio* neutrophiles/lymphocytes (celle-ci étant davantage causée par une neutrophilie absolue que par une lymphopénie), indique que les chevaux ont subi un stress (Rossdale *et al.*, 1982 ; Wong *et al.*, 1992).

La compréhension de la réponse au stress joue un rôle très important dans l'amélioration de la santé et des résultats sportifs des athlètes humains (Budgett, 1990 ; Nieman *et al.*, 1990 ; Nieman, 1997). La réponse adéquate au stress constitue un facteur critique de l'entraînement des athlètes de toutes disciplines (Angeli *et al.*, 2004 ; Rivero *et al.*, 2008). En médecine équine, la réduction de l'impact d'un stress est un facteur essentiel pour obtenir de meilleures performances d'un cheval tout en veillant au bien-être animal (Cappelli *et al.*, 2008). Malgré les nombreuses études (Kappel *et al.*, 1991 ; Wong *et al.*, 1992 ; Nieman *et al.*, 1994 ; Pyne *et al.*, 1994 ; Benschop *et al.*, 1996 ; Hines *et al.*, 1996 ; Raidal *et al.*, 2000 ; Connolly *et al.*, 2004 ; Büttner *et al.*, 2007 ; Donovan *et al.*, 2007) réalisées sur le système immunitaire, il existe

relativement peu de connaissances sur l'effet spécifique de l'exercice sur l'immunité des animaux domestiques. Chez l'homme (Büttner *et al.*, 2007) comme chez le cheval (Barrey *et al.*, 2006 ; Cappelli *et al.*, 2008), l'activité physique modérée peut avoir des effets bénéfiques sur la santé en général et favoriser le fonctionnement du système immunitaire. Inversement, l'exercice intense, comme celui accompli par les chevaux et autres animaux de performance, peut avoir des effets délétères sur le système immunitaire. Il provoque des changements de la formule sanguine, et induit l'expression de gènes qui semblent être en relation avec le syndrome de surentraînement dans les deux espèces (Barrey *et al.*, 2006 ; Büttner *et al.*, 2007 ; Cappelli *et al.*, 2007). Les athlètes humains soumis à un programme d'entraînement intense peuvent développer une dimi-

nution significative des performances, associée à des signes systémiques qui ne disparaissent pas malgré deux semaines de repos adéquat ; cette description correspond au « syndrome de surentraînement » (Budgett, 1998 ; Angeli *et al.*, 2004). Cette condition, liée au stress, se compose d'une altération des fonctions physiologiques d'adaptation aux performances, impliquant des dysfonctions immunitaires, des anomalies biochimiques et des dépressions psychologiques (Angeli *et al.*, 2004). Le terme « syndrome de surentraînement » pourrait être utilisé pour des chevaux soumis à un entraînement intensif qui présentent d'importantes diminutions de performances pendant plus de deux semaines, sans aucune raison clinique apparente (Rivero *et al.*, 2008).

La réaction de l'organisme à l'exercice est une réponse coordonnée de plusieurs systèmes. Elle conduit à des modifications multiples et complexes des systèmes de régulation par l'induction des protéines de choc, la modulation de la réponse inflammatoire (cytokines pro et anti-inflammatoires) et la génération de radicaux oxygènes et nitrogènes, qui, en plus de leurs effets néfastes, jouent un rôle crucial dans le signallement cellulaire (Connolly *et al.*, 2004 ; Ziecker *et al.*, 2005). Une des molécules qui orchestre la réponse à l'exercice est l'adrénaline. Elle est sécrétée par les glandes surrénales lors d'état de stress ou d'activité physique et participe à l'adaptation de l'organisme face à certaines situations (Elenkov, 2007).

Le phénotype d'un organisme et sa réponse à un environnement sont déterminés par l'activité combinée de milliers de gènes dont l'expression est coordonnée dans le temps et dans l'espace. Le but d'une approche moléculaire, selon la science des « omiques », est de comprendre le système biologique complexe qui modélise la relation entre la mise en place du réseau moléculaire et la réponse phénotypique observée. L'utilisation de la technologie des microdamiers va permettre cette approche moléculaire, grâce à l'analyse des profils d'expression génique.

Les connaissances des mécanismes moléculaires de la réponse au stress chez un athlète équin peuvent apporter des renseignements importants pour affiner et préciser la planification d'un programme d'entraînement approprié afin d'obtenir les meilleures performances, de préserver le bien-être de l'animal, et d'éviter les syndromes de surentraînement (Cappelli *et al.*, 2008).

Au cours de l'histoire, le cheval a été sélectionné pour ses qualités athlétiques (eg. force, vitesse, endurance). À l'heure actuelle, il est un élément à part entière du monde des compétitions sportives. Il est donc soumis aux mêmes pressions d'entraînement et de performance que les athlètes humains et représente à ce titre un excellent modèle animal pour apprécier les effets de l'exercice intense.

Les leucocytes sont les cellules de choix pour évaluer la réponse immunitaire d'un individu à l'échelle transcriptomique (Fehrenbach, 2007 ; Cappelli *et al.*, 2009).

D'une part, cette revue a pour but de recenser les interrelations connues entre l'adrénaline, le stress causé par l'exercice et la réponse immune. D'autre part, elle considère la contribution potentielle des microdamiers à une meilleure compréhension des effets d'un stress et plus particulièrement celui de l'exercice sur l'immunité.

2. EFFET DE L'ADRÉNALINE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

L'adrénaline, aussi nommée épinéphrine, est à la fois une hormone et un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines. C'est une des hormones essentielles, sécrétée en réponse à un état de stress ou en vue d'une activité physique, par la médullaire des glandes surrénales (Wong *et al.*, 2008). Les principales hormones de stress, glucocorticoïdes et catécholamines, affectent les fonctions immunitaires majeures, comme la présentation d'antigènes, la prolifération et la circulation leucocytaires, la sécrétion de cytokines et d'anticorps, et la sélection de la réponse T *helper* (Th) 1 ou de la réponse Th 2 (Elenkov et Chrousos, 2007).

2.1 Rôle des récepteurs adrénergiques

L'adrénaline agit en se fixant sur les récepteurs adrénergiques des cellules cibles. Les récepteurs adrénergiques appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G. Il en existe trois principaux types : $\alpha 1$, $\alpha 2$ et β , qui sont chacun divisés en plusieurs sous-types (Bylund, 1992).

Cette molécule a une brève durée d'action car elle est rapidement dégradée par deux enzymes, la catéchol-oxy méthyltransférase (COMT) et la

monoamine oxydase (MAO) (Jiang *et al.*, 2006). Ses effets dépendent fortement de la dose d'adrénaline et de la répartition des récepteurs α et β sur les cellules.

Le système immunitaire est en relation avec le système nerveux autonome. En effet, les neurotransmetteurs possèdent des récepteurs à la surface des cellules immunitaires. La fixation d'un neurotransmetteur sur un récepteur entraîne une cascade de réactions intracellulaires modulant l'expression génique, et donc la synthèse des protéines cellulaires. Comme la synthèse cellulaire est modifiée, le nombre et les caractéristiques des molécules et des récepteurs de surface peuvent être différents. La stimulation β -adrénergique des lymphocytes altère, par exemple, le niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), la cytolysé induite par les cellules T, la cytotoxicité dépendante des anticorps, la production d'anticorps, la formation de rosettes E, la maturation des thymocytes, la sensibilité aux mitogènes et l'expression des récepteurs cellulaires de surface (Crary *et al.*, 1983). La formation de rosettes E chez l'homme permet d'estimer la proportion de lymphocytes T parmi les lymphocytes totaux. Ce test repose sur la propriété distinctive des lymphocytes à se lier aux globules rouges de mouton, formant des rosettes, qualifiées de rosettes E (Gelfand *et al.*, 1979).

La stimulation des récepteurs adrénergiques mène aussi à une modulation du réseau de cytokines. Les catécholamines altèrent la production de ces médiateurs immunitaires dans les cellules sanguines périphériques ainsi que dans divers tissus comme le foie, la rate, les poumons, le cœur, les reins et la peau (Bergmann et Sautner, 2002). La régulation sympathique des cytokines est hautement dépendante du type de récepteurs qui est stimulé. Alors que la liaison aux α -adrénorécepteurs est associée à des effets essentiellement immunostimulants (eg. induction de TNF- α et d'IL-1 β), la stimulation des β -adrénorécepteurs a généralement des conséquences immunosuppressives (eg. inhibition de TNF- α et d'IL-1 β et induction d'IL-10) (Bergmann *et al.*, 1999). Lorsque les deux récepteurs sont stimulés par l'adrénaline, les effets médiés par les β -adrénorécepteurs dominant généralement ceux induits par les α -adrénorécepteurs (Bergmann et Sautner, 2002). Cependant, l'immunostimulation adrénergique peut être

régulée différemment, selon le type de cellules ou de tissus stimulés, ce qui sous-entend aussi des effets localisés (Bergmann et Sautner, 2002).

2.2. Modifications leucocytaires sanguines induites par l'adrénaline

En 1904, Loeper et Crouzon étaient les premiers à décrire une leucocytose prononcée suite à une injection sous-cutanée d'adrénaline (1 mg) chez des humains. La leucocytose réfère à une augmentation du nombre de leucocytes dans un organe particulier, comme le résultat d'une migration de ces cellules plutôt qu'une prolifération (Benschop *et al.*, 1996). L'administration d'adrénaline entraîne une leucocytose bi-phasique rapide et transitoire, composée d'une lymphocytose et suivie d'une neutrophilie dans le sang (Bergmann et Sautner, 2002), aussi bien chez les sujets humains que chez les sujets animaux (Benschop *et al.*, 1996). L'activation des récepteurs β_2 -adrénergique mène à la lymphocytose, dont une augmentation significative des cellules NK (Benschop *et al.*, 1996) alors que la neutrophilie répond à la stimulation des α -1-adrénorécepteurs par les catécholamines. La liaison de l'adrénaline aux α -adrénorécepteurs provoque par ailleurs un homing lymphocytaire (Bergmann et Sautner, 2002). Le *homing* lymphocytaire correspond à une migration trans-épithéliale des lymphocytes à partir des vaisseaux vers des tissus cibles spécifiques selon un programme de trafic cellulaire dirigé par des molécules chémo-attractives et des récepteurs d'adhésion (Sigmundsdottir et Butcher, 2008).

L'analyse des cellules mononucléées (CMN) chez l'homme révèle l'absence de modifications significatives des pourcentages relatifs des lymphocytes T (LT) totaux, des lymphocytes B (LB) ou des monocytes lors de l'administration d'adrénaline. En revanche, des changements des proportions des sous-populations de ces lymphocytes circulants surviennent. La proportion de cellules NK (cellules CD16+) augmente de manière significative au moment de l'administration d'adrénaline, mais se trouve à nouveau diminuée 2 heures post-injection. D'un autre côté, la proportion de monocytes (cellules CD14+) augmente significativement 2 heures après le stress (Kappel *et al.*, 1991).

IL-12, IFN γ et TNF α sont les principales cytokines pro-inflammatoires.

Parmi elles, IL-12 est le principal promoteur de la différenciation Th-1 et induit une réaction immunitaire à médiation cellulaire. Les cytokines Th2, responsables de la réaction immunitaire à médiation humorale, IL-4 et IL-10, sont les principales cytokines anti-inflammatoires. Les réponses Th1 et Th2 sont réciproquement inhibitrices (Elenkov et Chrousos, 2002). La stimulation des β -adrénorécepteurs par l'épinéphrine a des conséquences immunosuppressives (Bergmann et Sautner, 2002), dont l'inhibition de la production d'IL-12 par les cellules Th1 (Elenkov et Chrousos, 2002), de TNF α et la stimulation de production d'IL-10 (Bergmann et Sautner, 2002). La réponse au stress consiste en une réaction inflammatoire systémique à part entière qui, en retour, entraîne l'induction d'une réponse Th2, qui protège l'organisme d'une réaction généralisée exagérée par la réponse Th1 et les cytokines pro-inflammatoires (Elenkov et Chrousos, 2007). Les effets des hormones du stress sur l'équilibre Th1/Th2 de la réponse immunitaire ne sont pas évidents dans certaines conditions ou pour certaines réponses locales, spécifiques d'un compartiment de l'organisme (Elenkov et Chrousos, 2002).

Des études révèlent que les LT, les macrophages et les neutrophiles peuvent aussi synthétiser *de novo* et libérer des catécholamines endogènes, qui peuvent alors réguler la fonction des cellules immunitaires de manière auto-crine ou paracrine par l'implication de récepteurs adrénergiques (Bergquist *et al.*, 1994 ; Flierl *et al.*, 2007). Par conséquent, il semble que les cellules phagocytaires et les lymphocytes peuvent représenter une source majeure, nouvellement reconnue, des catécholamines qui régulent la réponse inflammatoire (Flierl *et al.*, 2008).

3. EFFET DE L'EXERCICE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

La réponse directe de l'organisme à l'exercice est caractérisée par un effort systémique compensatoire afin de retrouver son homéostasie. Les modifications induites par l'exercice sont corrélées à l'intensité de celui-ci (Büttner *et al.*, 2007).

3.1. L'exercice : un stress

Les principaux effecteurs du système de stress incluent l'hormone de libération de la corticotropine, l'arginine

vasopressine, les glucocorticoïdes, les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) (Elenkov et Chrousos, 2007), ainsi que l'hormone de croissance et la dopamine (Peake *et al.*, 2004). Les concentrations plasmatiques des hormones de stress telles que l'hormone de croissance, l'adrénaline et la noradrénaline sont toutes élevées immédiatement après un exercice, qu'il soit intense ou modéré. D'autres hormones comme le cortisol et la dopamine n'augmentent qu'une heure après un exercice intense. Cette augmentation post-exercice est plus importante après un exercice intense pour le cortisol, l'hormone de croissance et la noradrénaline (Peake *et al.*, 2004). À titre d'exemple, chez l'homme, les niveaux de l'adrénaline et de la noradrénaline pendant l'exercice varient de 0,2 à 3 ng/ml, selon l'intensité de l'effort (Banister *et al.*, 1972).

Chez les chevaux, les brèves périodes d'exercice intense induisent des changements physiologiques qui sont caractérisés par une diminution du pH artériel sanguin et le développement d'une acidose lactique (Donovan *et al.*, 2007). Les effets de l'exercice soutenu, de l'entraînement et de la compétition ont été corrélés, chez des athlètes humains très entraînés, à une augmentation significative de leur susceptibilité aux infections communes (Midtvedt et Midtvedt, 1982 ; Roberts, 1986 ; Budgett, 1990 ; Nieman *et al.*, 1990 ; Caren, 1991). Alors que les recherches dans ce domaine se sont tout d'abord intéressées aux humains (Cowles, 1918 ; Fitzgerald, 1988 ; Keast *et al.*, 1988 ; Nieman *et al.*, 1990) et aux animaux de laboratoire (Hoffman-Goetz *et al.*, 1986 ; Simpson et Hoffman-Goetz, 1990), elles se sont plus récemment étendues aux animaux domestiques, spécialement aux athlètes équins (Wong *et al.*, 1992 ; Keadle *et al.*, 1993). L'exercice est ainsi reconnu comme un stress qui peut significativement modifier la réponse immunitaire de l'hôte et par conséquent, sa sensibilité aux maladies (Hines *et al.*, 1996 ; Raidal *et al.*, 2000).

3.2. Modifications leucocytaires sanguines induites par l'exercice

Dans la plupart des espèces, le cheval inclus, l'exercice produit des changements marqués dans le nombre et la distribution des leucocytes circulants. Le sang circulant ne contient normale-

ment pas plus de 1 à 2 % de la population cellulaire des leucocytes mais le nombre et la composition du pool de leucocytes circulants peuvent changer dramatiquement pendant et immédiatement après un exercice (Shephard, 2003). La leucocytose est la réponse la plus couramment observée suite à l'exercice ; elle apparaît généralement après tous les types d'exercice (Keast *et al.*, 1988 ; McCarthy et Dale, 1988 ; Field *et al.*, 1991). Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les lymphocytes sont augmentés en nombre lors d'un exercice à VO₂max (Van Eeden *et al.*, 1999). L'amplitude de cette leucocytose tend cependant à augmenter avec l'intensité et la durée de l'exercice, et diminue lorsque le niveau de condition physique augmente (Raidal *et al.*, 2000).

Lorsque les leucocytes sanguins entrent dans la circulation sanguine, une proportion d'entre eux, variable selon les espèces, adhèrent aux vaisseaux sanguins et constituent un pool de réserve appelé pool marginal (Jain *et al.*, 1993). Selon Van Eeden et collaborateurs (1999), les vaisseaux sanguins pulmonaires sont un réservoir particulièrement important de leucocytes marginaux. Par ailleurs, la rate a la propriété de reconnaître et de capturer les leucocytes sénescents dans ses capillaires (Farstad *et al.*, 1991). L'exercice et les catécholamines entraînent la mobilisation de ces deux populations, les leucocytes marginaux (Benschop *et al.*, 1996) et les leucocytes normalement destinées à la destruction au niveau de la rate (Shephard, 2003).

D'après Pyne et collaborateurs (1994), l'augmentation du nombre de neutrophiles circulants avec l'exercice pourrait également résulter de la démargination des cellules à partir de la moelle osseuse (médiée par le cortisol) et de la réponse inflammatoire liée aux dommages tissulaires induits par l'exercice. Cependant, les travaux de Van Eeden et collaborateurs (1999) ont montré que les leucocytes affluant lors de l'exercice intense ne proviennent pas de la moelle osseuse. Pour parvenir à cette conclusion, les auteurs se sont appuyés sur des marqueurs cellulaires tels que la L-sélectine des PMN. En effet, les jeunes PMN de la moelle osseuse sont exprimés à un niveau faible lors de l'exercice alors que les jeunes PMN, relargués par la moelle osseuse expriment de haut niveau de L-sélectine et ce niveau

diminue au cours de la vie des PMN. Or, la L-sélectine des PMN est exprimée à un niveau faible lors de l'exercice.

En plus des variations de sous-populations cellulaires et de leurs caractéristiques phénotypiques, les capacités fonctionnelles des cellules sont aussi différentes. Suivant la mobilisation dans la circulation et la migration dans les tissus, induites par l'exercice, les neutrophiles exécutent l'adhésion, la phagocytose de bactéries ou de fragments tissulaires, la dégranulation de granules cytoplasmiques et, en fin de compte, l'activation du mécanisme oxydatif (Pyne, 1994). D'après l'étude de Donovan et collaborateurs (2007), la leucocytose est principalement le résultat d'une neutrophilie : le nombre de neutrophiles dès la fin de l'exercice, 2 heures et 6 heures après, était significativement augmenté par rapport à la valeur préexercice. Six heures après l'exercice, le pourcentage de ces neutrophiles dans la population leucocytaire totale était augmenté seulement de 6 %, alors que la production des radicaux oxygénés (ROS) dans le même échantillon était augmentée de plus de 35 % (Donovan *et al.*, 2007). Les différences entre le nombre de neutrophiles et la production de ROS par les leucocytes étaient encore plus évidentes 24 heures après l'exercice. À ce temps, le pourcentage de neutrophiles dans la population leucocytaire totale était augmenté de 7 % par rapport aux valeurs préexercices, alors que la production de ROS par les leucocytes avait augmenté de plus de 80 % (Donovan *et al.*, 2007). Ces constatations suggèrent que l'augmentation de la production de ROS détectée dans cette étude était principalement le résultat de changements de l'état d'activation cellulaire, et non celui d'une altération de la composition de la population leucocytaire.

Les cellules NK ont un rôle important dans la réponse immune primaire contre les infections virales et la propagation des pathologies malignes (Herbermann, 1981 ; Pedersen, 1985). L'activité de ces cellules augmente aussi bien durant un stress physique, exercice ou phénomène traumatique, que sous l'effet d'une perfusion d'adrénaline et redescend en dessous du niveau basal 2 heures après la fin de ces événements (Kappel *et al.*, 1991). L'augmentation de cette activité est liée à l'augmentation du nombre de cellules NK (cellules CD16+) dans le

sang (Kappel *et al.*, 1991). L'activité des cellules NK est inhibée par les prostaglandines et potentiellement stimulée par des cytokines comme l'interféron (IFN)- α et l'interleukine (IL)-2 (Pedersen *et al.*, 1988). L'étude de Kappel et collaborateurs (1991) montre que la population de monocytes (CD14+) double deux heures après la perfusion d'adrénaline, et suggère que ces monocytes libèrent des prostaglandines qui inhibent l'activité des cellules NK.

3.3 Rôle des molécules d'adhésion de surface dans la modification du « trafic » cellulaire

Un phénomène central du processus d'inflammation, est l'augmentation de l'expression des molécules de surface des cellules endothéliales qui supportent l'adhésion des leucocytes sanguins (Bevilacqua, 1993). Les molécules d'adhésion endothélium-leucocytes interagissent selon une reconnaissance ligand-récepteur. En réponse à certains médiateurs de l'inflammation, les cellules endothéliales redistribuent à leurs surfaces des molécules d'adhésion, en quelques minutes à partir de granules de stockage ou après une période de quelques heures à quelques jours à partir d'une biosynthèse cellulaire. Ainsi les molécules d'adhésion endothélium-leucocytes, les cellules associées et les médiateurs solubles travaillent de concert pour diriger le mouvement des leucocytes sanguins (Bevilacqua, 1993).

L'expression des molécules d'adhésion varie selon le niveau de maturité et d'activation des leucocytes (Shephard, 2003). Lymphocytes, neutrophiles et cellules endothéliales portent tous des récepteurs de catécholamines, et ce nombre de récepteurs varie selon l'exposition aux catécholamines (Van Tits *et al.*, 1990). L'exercice augmente la densité de récepteurs adrénergiques à la surface des cellules immunitaires (Van Tits *et al.*, 1990). Les lymphocytes, les PMN et les cellules endothéliales possèdent des récepteurs adrénergiques β_2 . La stimulation de ces récepteurs entraîne une modification des molécules d'adhésion à la surface de ces cellules, responsable d'une diminution de l'adhésion des globules blancs à l'endothélium (Van Eeden *et al.*, 1999). Cependant, l'inhibition de ces récepteurs par des β -bloquants ne réduit que partiellement la leucocytose induite par l'exercice (Van Eeden *et al.*, 1999).

Les neutrophiles sont les premiers intervenants en cas d'infection et jouent un rôle important dans la réponse immunitaire au niveau des lésions tissulaires (Peake, 2002), autant pour leur rôle dans la partie efférente (e.g. phagocytose et dégranulation) qu'afférente (e.g. libération de molécules immunomodulatrices) de la réponse immune (Pyne, 1994). Ces cellules réagissent en reconnaissant et en se liant, grâce à leurs récepteurs de surface, aux immunoglobulines (Ig)G et aux protéines du complément qui couvrent la surface des agents pathogènes et les débris tissulaires. Ce processus initie une cascade de réactions intracellulaires qui entraîne la libération d'enzymes (dégranulation) et de radicaux oxygènes (activité respiratoire) par les neutrophiles (Crockett-Torabi et Fantone, 1990 ; Fallman *et al.*, 1993). Ensemble, les enzymes et les radicaux oxygènes permettent la destruction et la dégradation des agents pathogènes et des fragments tissulaires endommagés (Weiss, 1989). Peake et collaborateurs (2004) ont montré que l'expression des récepteurs de surface (CD16, CD11b, CD35) des neutrophiles était diminuée suite à un exercice intense. CD35 et CD11b sont des récepteurs du complément et CD16 est un récepteur de faible affinité des IgG (Abbas *et al.*, 1994). La diminution des récepteurs peut être un mécanisme adaptatif pour éviter les réactions inflammatoires excessives suite aux dommages musculaires induits par l'exercice, bien que cette activité ne semble pas interférer avec l'activité oxydative et de dégranulation des neutrophiles (Peake *et al.*, 2004). Par ailleurs, les récepteurs libérés de la surface cellulaire après l'exercice, ne sont pas remplacés à court terme, ce qui peut avoir des conséquences délétères pour la protection de l'individu contre les infections (Peake *et al.*, 2004). Le CD11b est un récepteur de surface d'adhésion cellulaire, c'est pourquoi la diminution de son expression peut permettre l'extravasation des neutrophiles et leur mobilisation au niveau des tissus (Davey *et al.*, 2000).

Le roulement initial des leucocytes à la surface des vaisseaux, avant leur margination à travers la paroi, semble médié par des sélectines, comme les P- et E-sélectines dérivées de l'endothélium et la L-sélectine des leucocytes (Kuebler *et al.*, 1997 ; Goor *et al.*, 2006). La L-sélectine représente une molécule importante du proces-

sus de margination des PMN dans les parois des veinules post-capillaires de la circulation systémique et pulmonaire (Zimmerman *et al.*, 1992 ; Bevilacqua M.P., 1993 ; Kuhnle *et al.*, 1995 ; Kuebler *et al.*, 1997). La fucoïdine est un polymère sulfaté du fucose, inhibitrice des L- et P- sélectine (Kuebler *et al.*, 1997). Après traitement à la fucoïdine, le roulement des leucocytes est réduit de 75 à 83 % respectivement dans les artérioles et les veinules pulmonaires, sans affecter le processus d'adhésion des leucocytes. Dans les capillaires alvéolaires, suite au traitement à la fucoïdine, le temps de transit des leucocytes au travers des capillaires pulmonaires est réduit de 62 %, ce qui suggère, en plus des facteurs mécaniques, que les sélectines contribuent de manière significative à la rétention des leucocytes dans le poumon (Kuebler *et al.*, 1997).

L'exercice entraîne une lymphocytose et une diminution de l'expression des L-sélectines des lymphocytes (Van Eeden *et al.*, 1999). La majorité des LT vierges et LB expriment des L-sélectines, tandis que seulement une sous-population de cellules T mémoires et de cellules NK sont L-sélectine positives (Tedder *et al.*, 1995). Par contre, la L-sélectine est faiblement exprimée par la majorité des lymphocytes spléniques (Tedder *et al.*, 1990). La mobilisation des lymphocytes exprimant un faible niveau de L-sélectine, provenant de la rate ou des poumons, peut aboutir à la diminution des L-sélectines observée lors de l'exercice (Van Eeden *et al.*, 1999).

3.4. Contribution de l'adrénaline dans les modifications leucocytaires sanguines induites par l'exercice

La preuve que les catécholamines sont impliquées dans les changements du trafic leucocytaire induits par l'exercice est assez forte. Elle est soutenue par plusieurs points tels que les connaissances de l'effet des catécholamines sur les récepteurs β des lymphocytes, la corrélation entre l'augmentation de la concentration de catécholamines induite par l'exercice et du comptage des cellules sanguines, l'analogie avec la réponse à d'autres types de stress qui causent la sécrétion de catécholamines, les réponses aux perfusions de catécholamines et d'agents β -bloquants, les réponses chez les patients avec des déficiences d'adhésion cellulaires, les réponses obtenues suite à une splénectomie et

les études *in vitro* (Sherphard *et al.*, 2003).

Exercice et perfusion de catécholamines augmentent le comptage sanguin de leucocytes (Van Eeden *et al.*, 1999). La leucocytose est évidente pendant les 24 heures suivant l'exercice (Hines *et al.*, 1996 ; Donovan *et al.*, 2007) et la neutrophilie est détectée durant les 6 premières heures après l'exercice (Wong *et al.*, 1992 ; Donovan *et al.*, 2007).

Lors d'un exercice modéré, l'augmentation du nombre de leucocytes est plutôt liée aux concentrations plasmatiques de noradrénaline, mais avec un exercice plus intense, les concentrations d'adrénaline présentent une importance dominante (Brenner *et al.*, 1998 ; Sherphard *et al.*, 2003). En général, l'amplitude des effets tend à augmenter avec la durée et l'intensité de l'exercice (Hines *et al.*, 1996).

Si les catécholamines portent la majeure partie de la responsabilité des changements du trafic leucocytaire lors de l'exercice, il reste à définir les contributions respectives de la norépinéphrine et de l'épinéphrine dans ce processus (Sherphard *et al.*, 2003). De ce fait, les variations d'intensité, de durée, de type spécifique d'activité peuvent avoir des effets significatifs sur la réponse du système immunitaire et il faut garder à l'esprit pour les protocoles d'étude que la concentration plasmatique de noradrénaline est supérieure lors d'un exercice que lors d'une perfusion d'adrénaline (Kappel *et al.*, 1991). Des perfusions d'épinéphrine (Crary *et al.*, 1983 ; Van Tits *et al.*, 1990 ; Schedlowski *et al.*, 1996) ou de norépinéphrine (Schedlowski *et al.*, 1993 ; Schedlowski *et al.*, 1996 ; Nagao *et al.*, 2000) dans des doses appropriées peuvent copier certains traits de la réponse leucocytaire à l'exercice (Sherphard *et al.*, 2003).

En plus des changements du nombre de leucocytes circulants, des changements de la fonction des leucocytes suite à l'exercice ont été démontrés dans plusieurs espèces, incluant le cheval (Wong *et al.*, 1992 ; Hines *et al.*, 1996).

3.5. Interrelations entre l'exercice, le stress et la réponse immune

Le système immunitaire (non spécifique, aussi bien que spécifique), est affecté par l'exercice. Cependant, les résultats des études immunitaires restent contradictoires (Hines *et al.*,

1996), probablement à cause d'un nombre de facteurs pouvant influencer les résultats, parmi lesquels sont la complexité du système immunitaire et les différences entre les espèces et les protocoles expérimentaux (type d'exercice, intensité, durée, entraînement) (Pederson *et al.*, 1988 ; Nieman *et al.*, 1990 ; Field *et al.*, 1991 ; Kappel *et al.*, 1991 ; Wong *et al.*, 1992 ; Keadle *et al.*, 1993 ; Raidal *et al.*, 2000).

Définir la relation entre l'exercice, le stress et la réponse immunitaire représente ainsi un challenge de par le nombre de facteurs impliqués. Pour cette raison, il est essentiel pour tout protocole de recherche de définir la nature de l'exercice étudié, car les variations d'intensité, de durée, de type spécifique d'activité peuvent avoir des effets significatifs sur la réponse du système immunitaire.

L'augmentation immédiate de la concentration du cortisol dans le sérum après l'exercice, associée à l'augmentation du ratio neutrophiles : lymphocytes (celle-ci étant davantage causée par une neutrophilie absolue que par une lymphopénie), indique que les chevaux ont subi un stress (Rossdale *et al.*, 1982 ; Wong *et al.*, 1992).

Le stress est souvent perçu comme immunosuppresseur, mais de récentes études indiquent que les hormones de stress ont une influence pléiotropique et variable sur la réponse immunitaire (Elenkov et Chrousos, 2002 ; Jiang *et al.*, 2006). D'un point de vue systémique, elles inhibent la réponse Th1, pro-inflammatoire, et induisent une orientation Th2, tandis que la réponse locale stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'axe histamino-corticotrope. À travers ce mécanisme, un système de stress hyper- ou hypo-actif associé à des modifications de la réaction systémique anti-inflammatoire, et/ou l'hyperactivité des facteurs locaux pro-inflammatoires, peut jouer un rôle dans la pathogénie des inflammations chroniques et dans les maladies immunes (Elenkov et Chrousos, 2007).

Selon Hines et collaborateurs (2006), l'exercice intense induit une immunosuppression qui augmente avec l'intensité et la durée de l'exercice. Alors qu'un entraînement modéré semble associé à un renforcement de la réponse immunitaire et une amélioration de la résistance aux maladies, le surentraînement peut quant à lui avoir des effets suppressifs à long

terme. Les résultats de l'étude menée par Donovan et collaborateurs (2007) étayaient l'idée que l'exercice intense induit des altérations de la fonction immunitaire innée chez les chevaux, qui peuvent persister jusqu'à 72 heures après l'exercice.

Une simple période d'exercice peut altérer transitoirement la fonction antimicrobienne des neutrophiles et les mécanismes de défense non spécifiques, mais pas l'immunité spécifique chez le cheval.

4. LE MICRODAMIER D'EXPRESSION : UN OUTIL POTENTIELLEMENT PERFORMANT D'ÉTUDE DE L'EXPRESSION GÉNÉTIQUE

4.1 La science des "ohmiques"

La compréhension du fonctionnement cellulaire, tissulaire et systémique face à un environnement particulier ou à une condition spécifique nécessite la bonne connaissance de l'ensemble des niveaux d'expression et de régulation au sein de la cellule, mais aussi de l'interconnexion de toutes les cascades moléculaires qui peuvent intervenir. De telles approches globales sont récemment devenues possibles grâce au progrès des biotechnologies et de l'informatique. Différents domaines scientifiques correspondent à l'étude des différents niveaux d'expression cellulaire.

La génomique s'intéresse à la molécule d'ADN, support héréditaire de l'information cellulaire. Cette approche vise à séquencer l'ensemble des gènes d'un organisme, et à repérer leur disposition chromosomique par la génomique structurale, ainsi qu'à étudier la fonction de ces gènes et leurs interactions grâce à la génomique fonctionnelle. La recherche scientifique a déjà permis le séquençage de nombreux génomes, aussi bien d'animaux, de végétaux que de microorganismes (<http://genome.ucsc.edu/index.html>).

La protéomique est une science qui étudie des ensembles de protéines synthétisées par une cellule (protéome), notamment leurs rôles, leurs structures, leurs localisations et/ou leurs interactions (Nibbe *et al.*, 2010), selon les moyens d'approche et d'étude utilisés. L'analyse protéomique permet de faire l'inventaire des protéines présentes dans une cellule ou dans un compartiment cellulaire dans des conditions physiologiques ou expérimentales

précises. Alors que le génome d'une cellule est constant (si on excepte les modifications épigénétiques), le protéome est variable et reflète le produit fonctionnel de l'expression génique de la cellule (De Roos et McArdle, 2008). Le protéome d'une cellule est, en quelque sorte, une photographie moléculaire de la cellule à un instant donné. Il se distingue d'un autre autant par la variation de quantité d'une protéine donnée que par la présence ou l'absence de certaines protéines (Paakkonen et Tjaderhane, 2010). L'analyse des multiples fonctions des protéines et la caractérisation de leurs origines génétiques sont essentielles pour la compréhension des processus physiopathologiques au sein des cellules et des individus. Elle permet, entre autres, d'appréhender les mécanismes d'action des agents pathogènes.

Enfin, la transcriptomique, intermédiaire entre ces deux domaines, étudie l'expression de l'ensemble des gènes du génome (Paakkonen et Tjaderhane, 2010). L'expression d'un gène correspond à la quantité d'ARN associé présente dans la cellule. Ensemble, les transcrits représentent le transcriptome, spécifique d'un stade du développement ou d'une condition (Wang *et al.*, 2009). La transcriptomique permet ainsi de mettre en évidence la globalité des modifications de l'expression génique de cellules soumises à des conditions expérimentales ou pathologiques variables (Paakkonen et Tjaderhane, 2010). Cette approche est réalisable grâce à l'utilisation de technologies modernes à haut débit, comme les microdamiers.

4.2 La technologie des microdamiers d'expression

Le « microdamier », aussi nommé « puce génétique », ou « *microarray* », « *gene chip* », « *DNA chip* » dans la littérature anglaise, permet l'étude de l'expression de l'ensemble des gènes du génome simultanément. Il fournit ainsi des arrêts sur image de l'expression génique de l'ensemble des gènes du génome, à n'importe quel moment, dans n'importe quel tissu (Plomin et Schalkwyk, 2007).

Le microdamier consiste en une petite lame de la taille d'un timbre postal, qui contient des millions de séquences ADN ou oligo-nucléotidiques synthétisées auxquelles les séquences ADN complémentaires (ADNc) peuvent s'hybrider (Plomin et Schalkwyk, 2007). Les ADNc sont les séquences

ADN correspondant aux séquences ARN présentes dans l'échantillon et sont obtenues par transcription inverse (Trevino *et al.*, 2007). Le processus d'hybridation est le principe fondamental de la technique des microdamiers (Nadon et Shoemaker, 2002). Il repose sur la complémentarité des bases de deux brins, adénine étant complémentaire de thymine ou uracile et cytosine étant complémentaire de guanine. Le type cellulaire soumis à l'étude est d'abord isolé et son ARN en est extrait. La qualité de l'ARN est importante, c'est elle qui va influencer le résultat final du microdamier (Burgess, 2001). Des techniques, comme la transcription inverse couplée à la réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR), permettent d'augmenter la quantité de substrat et d'effectuer la transcription inverse de l'ARN en ADNc en présence de nucléotides marqués, soit par fluorescence, soit par marqueurs radiographiques (Burgess, 2001). Les cibles ainsi préparées sont purifiées, dénaturées et appliquées sur les plaques du microdamier (Burgess, 2001). Suite à cette étape d'hybridation, les plaques sont lavées plusieurs fois afin d'éliminer les brins non liés et les signaux non-spécifiques (Burgess, 2001). Elles sont alors prêtes pour être lues, grâce à l'acquisition d'images à partir des signaux émis par les plaques (Burgess, 2001). L'analyse de données se fait en six grandes étapes qui sont l'acquisition de l'image, le positionnement de la grille, l'extraction du signal, la normalisation et la filtration des données, l'analyse statistique et l'exploration des données (Nadon et Shoemaker, 2002). Les expériences réalisées à l'aide de microdamiers génèrent très rapidement des milliers d'informations et nécessitent une nouvelle approche scientifique en termes de stockage, de manipulation et de présentation des données (Burgess, 2001). Pour parvenir à l'interprétation des résultats obtenus, l'utilisation de programmes informatiques et statistiques est indispensable pour trier et analyser les multiples données fournies simultanément (Trevino *et al.*, 2007). Afin de dégager la quantité maximale d'informations à chaque expérience, il est aussi important d'avoir des outils bioinformatiques qui soient capables de faire le lien avec d'autres banques de données permettant d'obtenir automatiquement les informations qui sont déjà connues à propos des gènes d'intérêt (Burgess, 2001). Par exemple, UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>),

Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) et Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) fournissent des informations sur les séquences de transcription qui semblent provenir du même locus de transcription, ainsi que sur les similitudes de protéines, l'expression génique, et la localisation génomique.

Cette capacité élevée à générer des données apporte des avantages notables en termes de ressources et de temps.

4.3 Facteurs limitants

Les techniques d'utilisation des microdamiers, d'analyse et d'interprétation des résultats rencontrent néanmoins certaines limites.

La méthode d'analyse et de prélèvement des échantillons ne doit pas affecter le contenu moléculaire des cellules prélevées. Les colonnes utilisées pour le tri des cellules ou pour leur conservation peuvent activer des cascades de réaction cellulaire et ainsi stimuler ou inhiber l'expression de certains gènes, modulant ainsi le profil cellulaire de départ. De plus, pour éviter toute erreur, il est indispensable que tous les échantillons soient traités de façon identique (Burgess, 2001).

Comme la transcription génique n'est qu'une étape dans le processus de régulation qui mène à la synthèse de protéines fonctionnelles, il n'est pas toujours possible de corrélérer l'augmentation d'ARN dans les tissus avec des changements phénotypiques ou protéiques dans les tissus (Ramery *et al.*, 2009).

Le coût encore élevé de cette technologie est un facteur limitant le nombre d'échantillons pouvant être investigués par cette méthode (Trevino *et al.*, 2007). Ce qui entraîne l'analyse de petites cohortes et augmente ainsi le risque de faux-positifs. Mais le travail sur un nombre limité de données implique l'usage d'une multitude de tests correctifs qui, quant à eux, risquent d'augmenter le nombre de faux-négatifs (Büttner *et al.*, 2007).

Enfin, l'interprétation des résultats représente une performance, ne fut-ce que par le nombre de données à traiter (Burgess, 2001 ; Trevino *et al.*, 2007).

4.4 Profil d'expression d'ensembles géniques : empreinte caractéristique

La comparaison de l'expression génique, au sein d'une population cellulaire dans deux conditions bien définies, permet d'identifier les gènes dont l'expression varie d'une condition à l'autre (Zieker *et al.*, 2005). Ces gènes, appelés « gènes cibles » (Trevino *et al.*, 2007), « gènes d'intérêts » (Zieker *et al.*, 2005) ou « gènes candidats » (Fehrenbach, 2007 ; Ramery *et al.*, 2009) pourront faire l'objet d'études plus approfondies. Il est également possible de définir des « empreintes d'expression génique » en regroupant des gènes ayant des profils d'expression semblables et/ou des fonctions similaires associés à une condition physiologique ou à un génotype spécifique (Zieker *et al.*, 2005). Cette approche par « empreinte » concentre l'attention sur certains groupes de gènes d'intérêt impliqués dans l'état cellulaire étudié et permet finalement de définir leurs fonctions distinctes au niveau moléculaire (Burgess, 2001 ; Zieker *et al.*, 2005).

« L'empreinte d'expression génique » est ainsi devenue un outil utile en recherche et un outil diagnostic, avec de multiples applications. Les profils spécifiques d'expression, qui rapportent l'état physiologique d'une cellule, peuvent être utilisés pour diagnostiquer des maladies ou pour identifier des statuts physiologiques modifiés (Zieker *et al.*, 2005), pour étudier les tumeurs (Covell *et al.*, 2003), la progression des maladies, la réponse cellulaire à un stimulus, et l'identification des cibles de certaines drogues (Burgess, 2001 ; Trevino *et al.*, 2007).

Déterminer de telles empreintes requiert cependant l'analyse de centaines voire de milliers d'échantillons et nécessite donc un lourd investissement financier.

4.5 Outil de recherche au potentiel manifeste

La transcriptomique aborde un large éventail de sujets. Tout d'abord, elle permet d'étudier l'effet de différents traitements ou conditions sur l'expression génique et entraîne ainsi une meilleure compréhension de la fonction des gènes impliqués (<http://evolution.haifa.ac.il/html/html>). Des gènes ayant un profil d'expression similaire peuvent être impliqués dans des processus biologiques semblables et le réseau des mécanismes de régulation des gènes peut ainsi être élucidé (Trevino *et al.*, 2007 ; <http://evolution.haifa.ac.il/html/html>).

La transcriptomique est utilisée pour identifier des nouveaux sous-types de maladies ou de réponses à des maladies, des marqueurs de diagnostic ou de pronostic, des résultats de traitement, ainsi que des gènes cibles de molécules médicamenteuses (Zieker *et al.*, 2005 ; Trevino *et al.*, 2007 ; <http://evolution.haifa.ac.il>).

Ce progrès technologique a révolutionné l'approche basique de la recherche. Contrairement à la méthode traditionnelle de biologie moléculaire qui implique un gène dans une expérience, des centaines de milliers de gènes peuvent être analysés simultanément sous les mêmes conditions pour évaluer divers modèles biologiques, incluant les maladies, les traitements ou les manipulations expérimentales (Fehrenbach, 2007 ; Trevino *et al.*, 2007). C'est pourquoi le microdamier fournit des opportunités sans précédent pour l'analyse qualitative et quantitative de l'expression génique, de l'identification génique, et de la détection d'altération génique (Gu et Bertone, 2004). L'usage de ces motifs d'expression à grande échelle permet la classification de gènes sur base de leurs fonctions biologiques et la découverte de gènes de fonctions inconnues sur base de leur association à la maladie (Gu et Bertone, 2004).

Cet outil de travail, en plus d'être un outil de recherche établi, présente ainsi un potentiel notoire comme outil de diagnostic ou de pronostic de maladies et de leurs évolutions (Gu et Bertone, 2004 ; Venkatasubbarao *et al.*, 2004 ; Trevino *et al.*, 2007).

4.6 Le microdamier équin

Le projet international de cartographie des gènes équins a commencé en 1995, mené par la fondation Dorothy Russell Havemeyer (*Horse Genome Project*). En 2006, le NHGRI (*National Human Genome Research Institute*) a sélectionné le cheval dans la liste des génomes de mammifères à séquencer. En janvier 2007, le *Broad Institute* a réalisé le séquençage des 2,7 milliards de paires de bases d'ADN du génome du cheval (*Equus caballus*). L'utilisation d'algorithmes informatiques a encouragé la fabrication de bases de données annotées des gènes spécifiques d'espèce (Gu et Bertone, 2004). Le challenge est à présent d'annoter la carte génique équine, tout en intégrant la fonction des gènes ainsi que leurs interactions avec les protéines et l'environnement qui créent ce sys-

tème vivant dynamique et complexe (Ramery *et al.*, 2009).

Le séquençage du génome équin et l'évolution technologique de la transcriptomique ont permis la fabrication de microdamiers équins et l'arrivée sur le marché en 2009 d'un microdamier commercial spécifiquement dédié au cheval (Agilent®) devrait accélérer l'utilisation en routine des microdamiers en recherche équine.

4.7 Contribution potentielle des microdamiers dans la compréhension des interrelations entre le stress, l'exercice et la réponse immunitaire

Les mécanismes de régulation des effets de l'exercice sont complexes, ils impliquent un réseau d'hormones neuroendocriniennes et de cytokines (Raidal *et al.*, 2000). Ces agents induisent différentes cascades de réactions, dont certaines sont capables d'altérer la fonction immunitaire des cellules et, ainsi, influencer la susceptibilité aux maladies (Raidal *et al.*, 2000).

L'approche par microdamier permet une analyse globale qui aide à examiner les processus complexes telle que ceux impliqués dans la réponse à l'exercice. Elle permet de caractériser une « empreinte d'expression génique », spécifique à une condition, et de mettre en évidence de nouveaux gènes d'intérêt aux fonctions jusqu'à lors peu connues. Les produits de ces gènes et leur implication dans la physiopathologie du processus analysé peuvent alors être soumis à l'étude (Ramery *et al.*, 2009).

De nombreuses études des effets de l'exercice utilisent le microdamier comme outil d'analyse. Chez l'humain ainsi que chez le cheval, les microdamiers ont permis d'analyser les profils d'expression génique et de mettre en évidence de nouveaux gènes répondant à l'exercice dans les cellules musculaires (Chen *et al.*, 2003 ; Mahoney *et al.*, 2005 ; McGivney *et al.*, 2009) et sanguines (Connolly *et al.*, 2004 ; Zieker *et al.*, 2005 ; Barrey *et al.*, 2006 ; Cappelli *et al.*, 2007).

Les microdamiers offrent ainsi une opportunité pour mieux comprendre les cascades de régulation physiologiques et métaboliques induites en réponse à l'exercice (Zieker *et al.*, 2005). Par ailleurs, bien que certains gènes pertinents ne soient pas fortement régulés pendant l'exercice et par conséquent puissent être facilement négligés, la sensibilité de la technique

augmente les chances de détecter de tels gènes (Zieker *et al.*, 2005).

Il existe de nombreux profils d'expression génique des leucocytes en réponse à un stress induit par l'exercice physique (Fehrenbach, 2007). Ces profils varient selon différents facteurs tels que le type, l'intensité, et la durée de l'exercice, le statut d'entraînement de l'athlète, les conditions environnementales et la composition leucocytaire du sang (Fehrenbach, 2007).

Malgré tout, il semblerait que seul un nombre limité de gènes voit son expression modifiée par l'exercice (Büttner *et al.*, 2007). Les gènes, identifiés à ce jour, dont l'expression varie avec l'exercice intense interviennent dans différentes classes de molécules et de fonctions telles que : protéine du stress, protéine signal, matrice extracellulaire, substrat de transport, cytokines, facteurs de transcription, rôle dans le métabolisme énergétique, dans l'homéostasie du potassium, dans le métabolisme énergétique oxydatif, ou dans la réponse anti-inflammatoire (Zeibig *et al.*, 2005 ; Büttner *et al.*, 2007). Parmi l'ensemble de ces gènes certains jouent un rôle dans la réponse inflammatoire, ce qui confirme l'implication du processus inflammatoire suite à l'exercice.

Permettant l'étude des profils d'expression génique, l'utilisation du microdamier semble appropriée pour détecter les différentes interactions entre l'exercice, le stress et la réponse immunitaire.

5. CONCLUSION

L'étude de l'expression génique ne renseigne que sur les fondements de la réponse à l'exercice. D'autres analyses concernant les protéines, leurs fonctions, leurs cascades de réactions sont nécessaires pour fournir plus d'informations pertinentes quant aux modifications induites par l'exercice (Fehrenbach, 2007).

Cependant, les données obtenues par l'utilisation des microdamiers permettent de mieux caractériser et définir l'ensemble de la réaction de stress en réponse à un protocole pharmacologique ou physique du point de vue moléculaire.

Actuellement, les différences entre les études, non seulement dans la définition de l'intensité de l'exercice, dans la mise en place du protocole, mais aussi dans les techniques d'in-

vestigation, rendent l'évaluation et la comparaison des données difficiles. La simple variation du plan d'échantillonnage peut influencer les résultats, ainsi que d'autres facteurs plus généraux comme les variations diurnes ou saisonnières, l'âge, la génétique ou des facteurs de stress psychologiques ou environnementaux (Hines *et al.*, 1996). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer dans quelles mesures les changements subis par le système immunitaire lors de l'exercice chez le cheval sont préjudiciables ou bénéfiques pour l'hôte (Donovan *et al.*, 2000).

Il est à noter que les récents progrès des technologies d'investigation de l'expression génique peuvent mener à une rapide augmentation des informations disponibles au sujet des profils d'expression génique et, par conséquent, améliorer notre compréhension des contrôles moléculaires de nombreux systèmes (Burgess, 2001). De plus, l'ajustement des protocoles et la compilation de banques de données communes pourront permettre une analyse facilitée des résultats (Fehrenbach, 2007). Dans l'étude menée par Büttner et collaborateurs (2007) chez les humains, les valeurs d'expression génique basales, relevées avant les différents tests, étaient similaires, ce qui soutient la spécificité et la reproductibilité de la méthode microdamier employée. Il est important que la méthode présente une identité des résultats basaux car chez les chevaux, le nombre d'individus disponibles est réduit et la lignée génétique dont ils proviennent n'est pas contrôlée de la même manière que pour les animaux

de laboratoire, comme chez les souris par exemple, pour lesquelles il est possible d'obtenir un grand nombre d'individus d'une lignée génétique définie (e.g. la lignée Balb/c).

La compréhension des cascades moléculaires au niveau génétique peut apporter une contribution précieuse quant à la définition des effets de l'exercice sur le système immunitaire, et ainsi permettre le développement de moyens d'amélioration de la réponse immune. Alors que la majorité de l'attention a été portée sur le rôle délétère de l'exercice sur l'immunité, celui-ci peut aussi avoir des effets bénéfiques. L'amélioration de la compréhension de la relation entre l'exercice et le système immunitaire a ainsi de nombreuses applications pour le contrôle des maladies dans de multiples espèces (Hines *et al.*, 1996). En fin de compte, ceci pourrait donc conduire à la prévention et au contrôle des maladies, entre autres, par des recommandations de programmes d'entraînement et de protocoles de vaccinations adaptés. De plus, des régimes thérapeutiques spécifiques, destinés à maintenir la fonction du système immunitaire, pourraient être développés.

REMERCIEMENTS :

Un grand merci au Dr. A. Fraipont, pour son aide précieuse, et à I. Sbaï, R. Fares, et J.C. Bustin pour leur excellente assistance technique et administrative.

Summary

The expression microarray: a potentially useful tool for the understanding of the immune response to a stress caused by exercise in horses

Despite of numerous studies, the relationship between exercise, stress, and immune response is poorly defined.

Exercise is commonly reported as a stress that leads to changes in the homeostatic balance and can significantly alter the host's immune response and thus its susceptibility to disease. Adrenaline is the key molecule of any physiological process of stress.

Microarray technology, widely used in transcriptomic studies, allows the quantification of gene expression at the whole genome level. It could help to better define and characterise the interrelation between exercise, stress and immune response.

The aim of this review is to summarise known interrelations between the immune response to, respectively, adrenaline and exercise and to evaluate the potential of microarray technology for a better understanding of the immune response to stress caused by exercise.

REFERENCES

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., POBER J.S. Cellular and molecular immunology. Saunders : Philadelphia, 1994, 448 p.
- ANGELI A., MINETTO M., DOVIO A., PACCOTTI P. The overtraining syndrome in athlete: a stress-related disorder. *J. Endocrinol. Invest.*, 2004, **27**, 603-612.
- BANISTER E.W., GRIFFITHS J. Blood levels of adrenergic amines during exercise. *J. Appl. Physiol.*, 1972, **33**, 674-676.
- BARREY E., MUCHER E., ROBERT C., AMIOT F., GIDROL X. Gene expression profiling in blood cells of endurance horses completing competition or disqualified due to metabolic disorder. *Equine Vet. J. Suppl.*, 2006, **36**, 43-49.
- BEVILACQUA M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, **11**, 767-804.
- BENSCHOP R.J., RODRIGUEZ-FEUERHAHN M., SCHEDLOWSKI M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav. Immun.*, 1996, **10**, 77-91.
- BERGMANN M., GORNIKIEWICZ A., SAUTNER T., WALDMANN E., WEBER T., MITTLBOCK M., ROTH E., FUGGER R. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock*, 1999, **12**, 421-427.
- BERGMANN M., SAUTNER T. Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 2002, **114**, 752-761.
- BERGQUIST J., TARKOWSKI A., EKMAN R., EWING A. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994, **91**, 12912-12916.
- BUDGETT R. Fatigue and underperformance in athletes: the overtraining syndrome. *Br. J. Sports Med.*, 1998, **32**, 107-110.
- BUDGETT R. Overtraining syndrome. *Br. J. Sports Med.*, 1990, **24**, 231-236.
- BÜTTNER P., MOSIG S., LECHTERMANN A., FUNKE H., MOOREN F.C. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *J. Appl. Physiol.*, 2007, **102**, 26-36.
- BURGESS J.K. Gene expression studies using microarray. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2001, **28**, 321-328.
- BYLUND D.B. Subtypes of alpha1- and alpha2-adrenergic receptors. *FASEB J.*, 1992, **16**, 832-839.
- CAPPELLI K., VERINI-SUPPLIZIA., CAPOMACCIO S., SILVESTRI M. Analysis of peripheral blood mononuclear cells gene expression in endurance horses by cDNA-AFLP technique. *Res. Vet. Sci.* 2007, **82**, 335-343.
- CAPPELLI K., FELICETTI M., CAPOMACCIO S., SPINSANTI G., SILVESTRI M., SUPPLIZI A.V. Exercise induced stress in horses: Selection of the most stable reference genes for quantitative RT-PCR normalization. *BMC Mol. Biol.*, 2008, **9**:49, 1-8.
- CAPPELLI K., FELICETTI M., CAPOMACCIO S., PIERAMATI C., SILVESTRI M., VERINI-SUPPLIZI A. Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC Physiol.*, 2009, **9**:12, 1-6.
- CAREN L.D. Effects of exercise on the human immune system. *Bioscience*, 1991, **41**, 410-415.
- CHEN Y.W., HUBAL M.J., HOFFMAN E.P., THOMPSON P.D., CLARKSON P. Molecular responses of human muscle to eccentric exercise. *J. Appl. Physiol.*, 2003, **95**, 2485-2494.
- CONNOLLY P.H., CAIOZZO V.J., ZALDIVAR F., NEMET D., LARSON J., HUNG S.P., HECK J.D., HATFIELD G.W., COOPER D.M. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.*, 2004, **97**, 1461-1469.
- COVELL D.G., WALLQVIST A., RABOW A.A., THANKI N. Molecular classification of cancer: unsupervised self-organizing map analysis of gene expression microarray data. *Mol. Cancer Ther.*, 2003, **2**, 317-332.
- COWLES W. Fatigue as contributory cause of pneumonia. *Boston Med. Surg. J.*, 1918, **179**, 555.
- CRARY B., HAUSER S.L., BORYSENKO M., KUTZ I., HOBAN C., AULT K.A., WEINER H.L., BENSON H. Epinephrine-induced changes in the distribution of lymphocyte subsets in peripheral blood of humans. *J. Immunol.*, 1983, **131**, 1178-1181.
- CROCKETT-TORABIE E., FANTONE J.C. Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fc gamma receptor-specific mechanisms. *J. Immunol.* 1990, **145**, 3026-3032.
- DAVEY P.C., ZUZEL M., KAMIGUTI A.S., HUNT J.A., AZIZ K.A. Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b. *Br. J. Haematol.*, 2000, **111**, 934-942.
- DE ROOS B., MCARDLE H.J. Proteomics as a tool for the modeling of biological processes and biomarker development in nutrition research. *Br. J. Nutr.*, 2008, **99**, S66-71.
- DONOVAN D.C., JACKSON C.A., COLAHAN P.T., NORTON N.N., CLAPPER J.L., MOORE J.N., HURLEY D.J. Assessment of exercise-induced alterations in neutrophil function in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2007, **68**, 1198-1204.
- ELENKOV I.J., CHROUSOS G.P. Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, **966**, 290-303.
- ELENKOV I.J., CHROUSOS G.P. Stress system: organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation*, 2007, **13**, 257-267.
- FALLMAN M., ANDERSSON R., ANDERSSON T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement opsonized particles. *J. Immunol.*, 1993, **151**, 330-338.

- FARSTAD B.S., SUNDREHAGEN E., OPDAHL O., BENESTEAD H.B. Pulmonary, hepatic and splenic sequestration of technetium 99m-labeled autologous rabbit granulocytes: the graphic cell distribution after intravenous and intra-arterial injection, exsanguination and intra-arterial injection of cells passed through an intermediary host. *Acta Physiol. Scand.*, 1991, **143**, 211-222.
- FEHRENBACH E. Multifactorious microarray-based gene expression patterns in response to exercise. *J. Appl. Physiol.*, 2007, **102**, 7-8.
- FIELD C.J., GOUGEON R., MARLISS E.B. Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J. Appl. Physiol.*, 1991, **71**, 1089-1097.
- FITZGERALD L. Exercise and the immune system. *Immunol. Today*, 1988, **9**, 337-339.
- FLIERL M.A., RITTISCH D., NADEAU B.A., CHEN A.J., SARMA J.V., ZETOUNE F.S., MCGUIRE S.R., LIST R.P., DAY D.E., HOESEL L.M., GAO H., VANROOIJEN N., HUBER-LANG M.S., NEUBIG R.R., WARD P.A. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*, 2007, **449**, 721-725.
- FLIERL M.A., RITTISCH D., SARMA J.V., HUBER-LANG M., WARD P.A. Adrenergic regulation of complement-induced acute lung injury. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008, **632**, 93-103.
- GELFANDE W., SHORE A., GREEN B., LIN M.T., DOSCH H.M. The E-rosette assay: a cautionary note. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1979, **12**, 119-123.
- GOOR Y., GOOR O., WOLLMAN Y., CHERNICHOVSKI T., SCHWARTZ D., CABILI S., LAINA A. Fucoidin, an inhibitor of leukocyte adhesion, exacerbates acute ischemic renal failure and stimulates nitric oxide synthesis. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 2006, **40**, 57-62.
- GU W., BERTONE A.L. Generation and performance of an equine-specific large-scale gene expression microarray. *Am. J. Vet. Res.*, 2004, **65**, 1664-1673.
- HERBERMANN R.B. Natural killer (NK) cells and their possible roles in resistance against disease. *Clin Immunol. Rev.*, 1981, **1**, 1-65.
- HINES M.T., SCHOTT H.C., BAYLY W.M., LEROUX A.J. Exercise and immunity: a review with emphasis on the horse. *J. Vet. Intern. Med.*, 1996, **5**, 280-289.
- HOFFMAN-GOETZ L., KEIR R., THORNE R., HOUSTON M.E., YOUNG C. Chronic exercise stress in mice depresses splenic T lymphocyte mitogenesis in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, **66**, 551-557.
- JAIN N.C. Essentials of veterinary hematology. Wiley-Blackwell: Philadelphia, 1993, 417.
- JIANG J.L., QIU Y.H., PENG Y.P., WANG J.J. Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells. *Sheng Li Xue Bao*, 2006, **58**, 309-317.
- KAPPEL M., TVEDE N., GALBO H., HAAHR P.M., KJAER M., LINSTOW M., KLARLUND K., PEDERSEN B.K. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J. Appl. Physiol.*, 1991, **70**, 2530-2534.
- KEADLE T.L., POURCIAU S.S., MELROSE P.A., KAMMERLING S.G., HOROHOV D.W. Acute exercise stress modulates immune function in unfit horses. *J. Equine Vet. Sci.*, 1993, **13**, 226-231.
- KEAST D., CAMERON K., MORTON A.R. Exercise and the immune response. *Sports Med.*, 1988, **5**, 248-267.
- KUEBLER W.M., KUHNLE G.E., GROH L., GOETZ A.E. Contribution of L-Selectin to leukocyte sequestration in the pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J. Physiol.*, 1997, **501**, 375-386.
- KUHNLE G.E., KUEBLER W.M., GROH J., GOETZ A.E. Effect of blood flow on the leukocyte-endothelial interaction in pulmonary microvessels. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **152**, 1221-1228.
- LOEPER M., CROUZON O. L'action de l'adrénaline sur le sang. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.*, 1904, **16**, 83-108.
- MAHONEY D.J., PARISE G., MELOV S., SAFDAR A., TARNOPOLSKY M.A. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.*, 2005, **19**, 1498-1500.
- MC CARTHY D.A., DALE M.M. The leucocytosis of exercise a review and model. *Sports Med.*, 1988, **6**, 333-383.
- MC GIVNEY B.A., EIVERS S.S., MC HUGH D.E., MC LEOD J.N., O GORMAN G.M., PARK S.D.E., KATZ L.M., HILL E.W. Transcriptional adaptations following exercise in thoroughbred horse skeletal muscle highlights molecular mechanisms that lead to muscle hypertrophy. *BMC Genomics*, 2009, **10**:638.
- MIDTVEDT T., MIDTVEDT K. Sport and infection. *Scand. J. Soc. Med. Suppl.*, 1982, **29**, 241-244.
- NADON R., SHOEMAKER J. Statistical issues with microarray: processing and analysis. *Trends Genet.*, 2002, **18**, 265-271.
- NAGAO F., SUZUI M., TADEKA K., YAGITA H., OKUMURA K. Mobilization of NK cells by exercise: downmodulation of adhesion on NK cells by catecholamines. *Am. J. Physiol.*, 2000, **279**, R1251-1256.
- NIBBE R.K., KOYUTURK M., CHANCE M.R. An integrative: omics approach to identify functional sub-networks in human colorectal cancer. *PLoS Comput. Biol.*, 2010, **6**, e1000639.
- NIEMAN D., JOHANSEN L., LEE J., ARABATZIS K. Infectious episodes in runners before and after the LA Marathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 1990, **30**, 316-328.
- NIEMAN D.C. Risk of upper respiratory tract infection in athletes: an epidemiologic and immunologic perspective. *J. Athl. Train.*, 1997, **32**, 344-349.
- PAKKONEN V., TJARDERHANE L. High-throughput gene and protein expression analysis in pulp biologic research: review. *J. Endod.*, 2010, **36**, 179-189.
- PEAKE J.M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity:

- possible mechanisms of action. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2002, **49**, 49-100.
- PEAKE J., WILSON G., HORDERN M., SUZUKI K., YAMAYA K., NOSAKA K., MACKINNON L., COOMBES J.S. Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.* 2004, **97**, 612-618.
- PEDERSEN B.K. Natural killer cells in relation to disease: a review. *Allergy*, 1985, **40**, 547-557.
- PEDERSEN B.K., TVEDE N., HANSEN F.R., ANDERSEN V., BENDIX T., BENDIXEN G., BENDTZEN K., GALBO H., HAAHR P.M., KLARLUND K., SYLVEST J., THOMSEN B.S., HALKJAER-KRISTENSEN J. Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. *Scand. J. Immunol.*, 1988, **27**, 673-678.
- PLOMIN R., SCHALKWYLK L.C. Microarray. *Dev. Sci.*, 2007, **10**, 19-23.
- PYNE D.B. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.*, 1994, **17**, 254-258.
- RAIDAL S.L., LOVE D.N., BAILEY G.D., ROSE R.J. Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. *Res. Vet. Sci.*, 2000, **68**, 141-146.
- RAMERYE., CLOSSETR., BUREAU F., LEKEUX P. Expression microarray in equine sciences. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2009, **127**, 197-202.
- RIVERO J.L., VAN BREDA E., ROGERS C.W., LINDNER A., VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN M.M. Unexplained underperformance syndrome in sport horses: classification, potential causes and recognition. *Equine Vet. J.*, 2008, **40**, 611-618.
- ROBERTS J.A. Viral illnesses and sports performance. *Sports Med.*, 1986, **3**, 298-303.
- ROSSDALE P.D., BURGUEZ P.N., CASH R.S. Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. *Equine Vet. J.*, 1982, **14**, 293-298.
- SADALLAH S., HESS C., MIOT S., SPERTINI O., LUTZ H., SCHIFFERLI J.A. Elastase and metalloproteinase activities regulate soluble complement receptor 1 release. *Eur. J. Immunol.*, 1999, **29**, 3754-3761.
- SCHEDLOWSKI M., FALK A., RHONE A., WAGNER T.O.F., JACOBS R., TEWES U., SCHMIDT R.E. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J. Clin. Immunol.*, 1993, **13**, 344-351.
- SCHEDLOWSKI M., HOSCH W., OBERBECK R., BENSCHOP R.J., JACOBS R., RAAB H.R., SCHMIDT R.E. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent β_2 adrenergic mechanisms. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 93-99.
- SHEPHARD R.J. Adhesion molecules, catecholamines and leukocytes redistribution during and following exercise. *Sports Med.*, 2003, **33**, 261-284.
- SIGMUNDSOTTIR H., BUTCHER E.C. Environmental cues, dendritic cells and the programming of selective lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.*, 2008, **9**, 981-987.
- SIMPSON J.R., HOFFMAN-GOETZ L. Exercise stress and murine natural killer cell function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1990, **195**, 129-135.
- TEDDER T.F., PENTA A.C., LEVINE H.B., FREEDMAN A.S. Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1: identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J. Immunol.*, 1990, **144**, 532-540.
- TEDDER T.F., STEEBER D.A., CHEN A., ENGEL P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.*, 1995, **9**, 866-873.
- TREVINO V., FALCIANI F., BARRERA-SALDANA H.A. DNA Microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. *Mol. Med.*, 2007, **13**, 527-541.
- VAN EEDEN S.F., BICKNELL S., ENGLISH D., HOGG J.C. Changes in the expression of L-selectin on polymorphonuclear leukocytes as they age in the circulation. *Am. J. Physiol.*, 1997, **272**, 401-408.
- VAN EEDEN S.F., GRANTON J., HARDS J.M., MOORE B., HOGG J.C. Expression of the cell adhesion molecules on leukocytes that demarginate during acute maximal exercise. *J. Appl. Physiol.*, 1999, **86**, 970-976.
- VAN TITS L.J., MICHEL M.C., GROSSE-WILDE H., HAPPEL M., EIGLER F.W., SOLIMAN A., BRODDE O.E. Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via a beta 2-adrenergic, spleen-dependent process. *Am. J. Physiol.*, 1990, **258**, 191-202.
- VENKATASUBBARAO S. Microarray: status and prospects. *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 630-637.
- WANG Z., GERSTEIN M., SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, **10**, 57-63.
- WEISS S. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.*, 1989, **320**, 365-379.
- WONG D.L., TAI T.C., WONG-FAULL D.C., CLAYCOMB R., KVETNANSKY R. Adrenergic responses to stress: transcriptional and post-transcriptional changes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, **1148**, 249-256.
- WONG W.C., SMITH S.E., THONG Y.H., OPDEBEECK J.P., THORNTON J.R. Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 1414-1417.
- ZIECKER D., FEHRENBACH E., DIETZSCH J., FLIEGNER J., WEIDMANN M., NIESELT K., GEBICKE-HAERTER P., SPANAGEL R., SIMON P., NIESS AM., NORTHOFF H. cDNA-microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise. *Physiol. Genomics*, 2005, **23**, 287-294.
- ZIEKER D., ZIEKER J., DIETZSCH J., BURNET M., NORTHOFF H., FEHRENBACH E. cDNA-microarray analysis as a research

tool for expression profiling in human peripheral blood following exercise. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2005, **11**, 86-96.

ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M., MCINYRE T.M. Endothelial cell interaction with granulocytes : tethering and signaling molecules. *Immunol. Today*, 1992, **13**, 93-100.