

Détection de l'administration d'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval : Approche transcriptomique sur les leucocytes sanguins dans le cadre de la lutte antidopage

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2010
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

MERCADER, Victoria, Sidonie, Danielle
Née, le 10 Mars 1986 à SECLIN (NORD)

Directeur de thèse : Mr le Professeur TOUTAIN

JURY

PRESIDENT :
Mme. COUDERC Bettina

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEUR :
M. TOUTAIN Pierre-Louis
Mlle. BOULLIER Séverine

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. MARTIN Pascal

Ingénieur de recherche à l'UR66-INRA de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELF	
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENT CONTRACTUEL

M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORRAND Leni**, *Médecine Interne*
Mlle **DEBREUQUE Maud**, *Médecine Interne*
M **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
M. **IRUBETAGOYENA Iban**, *Médecine*
M. **LE BOEDEC Kevin**, *Médecine Interne*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A notre Président de thèse,

A Madame le Professeur Bettina COUDERC

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Médecin biologiste

**Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude**

A notre Jury de thèse,

A Monsieur le Professeur Pierre-Louis TOUTAIN

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Physiologie et Thérapeutique

**Qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail et de nous guider au cours
de sa réalisation,**

Sincères reconnaissance

A Mademoiselle le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie générale et médicale

**Pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de notre jury de
thèse,**

Sincères remerciements

A Monsieur le Docteur Pascal MARTIN

Ingénieur de recherche à l'UR66-INRA

Toxicologie Intégrative et Métabolisme

Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse

Sincères remerciements

A l'équipe de l'INRA

Thierry, Arnaud, Frédéric, Pascal, Alexandre pour leur aide auprès des chevaux au cours de la phase expérimentale de cette thèse même si ça n'était pas leur tasse de thé, le travail remarquable qu'ils ont fournis dans le traitement des échantillons et leur disponibilité tout au long de ce travail.

A l'équipe de l'UMR181

Le professeur Toutain et son équipe, Valérie, Cathy, Aude pour la mise à disposition des chevaux et du bâtiment de physiologie ainsi que leur aide pour la correction de ce travail et pour les démarches administratives

A Morgane et Julia avec qui j'ai réalisé la partie animale de cette thèse

Aux chevaux du Centre Equestre qui ont su nous supporter durant la durée de l'étude, malgré certaines manipulations contraignantes

A Colette pour sa gentillesse

A Lulu qui manque énormément à tous les vétos toulousains, repose en paix

Dédicaces

A Mes Parents,

Pour m'avoir fait découvrir l'équitation et m'avoir encouragée pendant toutes ces années afin que je puisse mener à bien tous mes projets

A Mes Sœurs,

Léna pour tous ces bons moments passés ensemble malgré quelques dérapages, reste comme tu es

Alexandra, continue à vivre tes rêves, je serais à tes côtés pour te soutenir

A Ma Famille,

Pépé, même si tu nous as quitté trop vite à mon goût, tu as toujours cru en moi et j'espère que de là-haut tu es fier de moi

Mamie, merci d'être là, malgré des hauts et des bas, merci de m'avoir accueillie

Ralph, mon parrain, pour son soutien au cours des ans, et sa femme Doris

A ceux que je n'ai pas connu et qui ont disparu trop tôt, Daniel et Sidonie, merci de m'avoir donné des parents formidables

A Mes Amis,

Ceux que j'ai perdu de vue mais avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ma vie, auprès des poneys, sur les concours, à l'école, je ne vous oublie pas : Anne, JP, Charles, Alice, Sophie, Clémentine, Justine,, Cécile et tous les autres

Ceux sur qui je peux compter et que je remercie du fond du cœur pour tous nos délires :

Maud, pour ce fabuleux Lamotte 2002 et ces soirées parisiennes, ainsi que ton frère Lionel et tes parents

Virginie, pour nos moments de joie et de galère communs

Julie, courage tu arrives au bout

Floriane, future maman, Jade, Fabienne et Lou

Rym, pour toutes ces années où l'on aurait pu se rencontrer et que finalement c'est à l'ENVT que l'on s'est retrouvé

Peter pour ces moments passés en Belgique, la main dans le rectum des juments

Paul et Julie pour leur délicieux restaurant à Ouistreham

Faby et Virginie, mes mamans d'adoption, pour ce fabuleux séjour en Irlande, hâte de remettre ça !

Justine, grâce à qui mes soirées sont égayées par ses aventures, et notamment grâce à ses fabuleuses histoires londoniennes

Delphine, reine des potins et pour ta porte toujours ouverte

Sabine pour tous les moments passés à la Cépière, et merci de m'avoir convaincue que les TF, c'est les meilleurs !!!

Isabelle et Stéphane, pour leur passion du poney Connemara, vivement Septembre !

L'équipe des Connemara Addict : Camille, Johanna, Galou ...

Laurent, pour les soirées Deauvilliennes, et ta force de vivre qui m'impressionne toujours

Sylvana, pour ton soutien et nos Mc Do « Mc internat » !

Mathilde et son gros Mack, ou comment une colique permet la création d'une belle amitié

Florence, ce passage à St Lô restera pour toujours dans ma mémoire, entre larmes et fous rires, j'espère que tu trouveras ce que tu cherches

Marion, pour ta bonne humeur et ce weekend de dingue, et à ton pti Yoyo alias La Yotte, j'espère qu'il sera à la hauteur lol !

Les Gellé-Desnoyersiens : Morgane, ma codétenue de thèse et qui est toujours opérationnelle pour faire des crêpes, Katia et son Momo pour les bons moments passés ensemble, au centre équestre et à l'école, Vanessa, Cyril et Birdy qui m'ont supporté moi et Akehla, ma Boubou pour nos moments dressage ...

Les ENVTiciens : Laura et son Bouli, pour nos soirées « déprime » mais aussi les purs moments passés à l'Île de Ré, les 2 Léa, Hélène et Stéphanie pour Montpellier, Justine (Malherbe Malherbe ! Et merci pour le squattage), Aurélia, Virginie ...

L'équipe du Centre Equestre de l'ENVT pour nos belles soirées et les remontées de moral : Claire, Sandrine, Séverine, Pauline, Mimi (hâte de passer te voir à Tahiti !), Céline, Sandrine B, Charles, Aurore, Caroline, Solène, Armelle, Bertrand ...

Benoit, Guillaume (un câlin à Tyran Star de ma part), Sébastien et Alain pour m'avoir fait découvrir le monde des galopeurs

Mes confrères et collègues de travail pour ce qu'ils m'ont appris : Arnaud, Benoît Marion, Muriel, Franck, Aurélien, Thierry, Linda, Grégory, Christophe et les autres ...

Et tous ceux que j'ai oublié, croisés au cours d'une soirée ou au travail

Je vous souhaite tout le bonheur du monde

A Mes Chevaux

Ceux qui ont croisé ma route, disparu ou non, qui m'ont appris les bases de l'équitation, les premières victoires, les premières chutes, qui m'ont permis de vivre des moments fabuleux : Hercule, Parodie, Folie, Réglisse, Champion, Domino, Boy, Toby, Hidalgo, Henzo, Glakenne, qui a partagé ma vie pendant 7 ans et qui m'a permis d'atteindre les étoiles, Inset, Rêve...

Ceux qui sont encore à mes côtés et grâce à qui je suis encore là et qui me comblent de bonheur : Story, la rescapée de la boucherie, qui me permet de m'évader et de vivre mes rêves les plus fous, Mascotte et Organza bientôt maman toutes les deux

A Akehla

Toujours fidèle au poste et qui partage ma vie d'éternelle voyageuse

*« Se promettre des choses à soi-même est le plus dur des défis.
Le plus beau est de les relever. »
Grégory Lemarchal*

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique (c = complémentaire, m = messenger)

COST : Comité d'Orientation Scientifique et Technique

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbant Assay

FDA : Food and Drug Administration

FEI : Fédération Equestre Internationale

FFE : Fédération Française d'Equitation

hCS : somatomammotropine chorionique humaine

GH : Growth Hormone (b : bovine, c : canine, e : équine, h : humaine, p : porcine, r : recombinante)

GH-BP : Growth Hormone Binding Protein

GHRH : Growth-Hormone-Releasing Hormone = somatolibérine

IGF : Insuline-like Growth Factor

IGF-BP : Insuline-like Growth Factor Binding Protein

LCH : Laboratoire des Courses Hippiques

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

OCA : Organic Consumers Association

PCR: Polymerase Chain Reaction

pI: Point Isoélectrique

RIA: RadioImmuno Assay

SIRH : Somatototropin Release Inhibiting Hormone, somatostatine

ST: somatotropine

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure I-1 : Tissu hypophysaire équin incorporé dans du LR Gold montrant une cellule somatotrope relativement bien préservée.....	20
Figure I-2 : Schéma de représentation de l'axe somatotrope.....	22
Figure I-3 : Concentrations plasmatiques en IGF-1 chez des chevaux à l'entraînement.....	33
Figure I-4 : Puce à ADN de la société Agilent TM	34
Figure I-5 : Schéma de l'analyse expérimentale.....	36
Figure I-6 : Exemple d'image finale obtenue après hybridation compétitive de deux échantillons à comparer sur une puce à ADN scannée et lue aux longueurs d'ondes correspondant aux spectres d'émissions des deux fluorophores utilisés.....	37
Figure I-7 : Exemple d'image obtenue après acquisition des données avec le logiciel GenePix Pro (Axon software).....	38
Figure I-8 : Les différentes méthodes de délimitation des spots.....	38
Figure I-9 : Méthodes de mesure du bruit de fond selon les logiciels utilisés.....	39
Figure I-10 : Illustration pour la mesure du ratio de l'intensité globale du spot.....	39
Figure I-11 : Exemple de transformation logarithmique.....	40
Figure I-12 : Exemple des deux types de représentation des données obtenues.....	41
Figure I-13 : Principe de la normalisation de Loess.....	42
Figure I-14 : Résultat d'une normalisation par la méthode de Loess.....	42
Figure I-15 : Les différentes étapes de la méthode k-means.....	43
Figure I-16 : Méthodes de calcul de distance pour chaque cluster.....	44
Figure I-17 : Exemple de visualisation des résultats.....	45
Figure I-18 : Principe général de la PCR.....	46
Figure I-19 : Courbe de PCR.....	47
Figure II-1 : Flacon d'EquiGen TM	52
Figure II-2 : Profils de migration électrophorétique des échantillons d'ARNs totaux leucocytaires.....	59
Figure II-3 : Mesures densitométriques des échantillons d'ARNs totaux leucocytaires.....	60

Figure II-4 : Dosage des ARNs totaux leucocytaires.....	61
Figure II-5 : Courbe de PCR quantitative en temps réel réalisée avec des amorces dessinées pour le gène de la β -actine du cheval sur les ADNc de 6 animaux différents, en duplicats.....	62
Figure II-6 : Plan d'hybridation dye-swap.....	64
Figure II-7 : Plan d'hybridation dye-switch.....	65
Figure II-8 : Plan d'hybridation correspondant aux questions 3 et 4.....	65
Figure II-9 : Scanner Axon 4100B.....	66
Figure II-10 : Images reconstruites des bruits de fond dans le rouge et dans le vert.....	68
Figure II-11 : Images reconstruites des log(R/G) avant (à gauche) et après (à droite) sélection des spots.....	69
Figure II-12 : MA-plots avant (gauche) et après (droite) correction de bruit de fond et normalisation.....	70
Figure II-13 : Intersections des sélections de gènes différentiellement exprimés entre les trois jeux de données J15 (Question 3), J17 (Question 4) et J15+J17 (Question 3 et Question 4)...	71
Figure II-14 : Intersections des sélections de gènes différentiellement exprimés entre les trois jeux de données J13 (Question 1), J15 (Question 3) et J17 (Questions 4).....	72
Figure II-15 : Histogramme des probabilités critiques (p-values) pour l'expérience de la question 2 chez les individus contrôles (gauche) et les individus traités à la GH (droite).....	73
Figure II-16 : Heatmap obtenue par une analyse statistique sans a priori, utilisant 54 transcrits sélectionnés et séparant finalement les individus contrôles des individus traités.....	75
Figure II-17 : Expression relative de 4 gènes candidats à J19.....	77

TABLEAUX

Tableau I-1 : Tableau d'homologie de séquence entre bGH et GH d'autres espèces en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chaque espèce.....	17
Tableau I-2 : Principaux types de puces à ADN.....	35
Tableau II-1 : Caractéristiques individuelles des chevaux utilisés pour l'essai et composition des lots expérimentaux.....	52
Tableau II-2 : Posologies pour EquiGen TM administrées aux chevaux du groupe « traités ».	53

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES	8
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	13
I- Première partie : un point sur les connaissances actuelles.....	15
1- Définition et biochimie de l'hormone de croissance.....	15
a. <i>Structure de l'hormone de croissance.....</i>	15
i. <i>Structures primaire et secondaire</i>	15
ii. <i>Structures tertiaire et quaternaire.....</i>	15
iii. <i>Origine génétique et homologie</i>	16
b. <i>Propriétés.....</i>	17
i. <i>Point isoélectrique</i>	17
ii. <i>Caractère antigénique.....</i>	17
iii. <i>Concentration plasmatique</i>	17
iv. <i>Métabolisme</i>	18
2- Production de la GH	19
a. <i>Mécanismes de la production</i>	19
i. <i>Lieux de production.....</i>	19
1. <i>Production par l'hypophyse</i>	19
2. <i>Autres sites de production</i>	19
ii. <i>Aspect cellulaire.....</i>	19
b. <i>Contrôle de la production.....</i>	20
i. <i>Rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire</i>	20
ii. <i>Rétrocontrôle.....</i>	21
iii. <i>Facteurs influençant la production</i>	23
1. <i>Facteurs stimulants</i>	23
2. <i>Facteurs inhibiteurs.....</i>	23
3- Action de la GH	24
a. <i>Au niveau de la cellule cible</i>	24
i. <i>Mécanisme d'action au niveau cellulaire.....</i>	24
1. <i>Caractérisation du récepteur.....</i>	24
2. <i>Mécanisme.....</i>	24
ii. <i>Effets sur le métabolisme.....</i>	24
1. <i>Métabolisme lipidique</i>	24
2. <i>Métabolisme protéique</i>	25
3. <i>Métabolisme glucidique.....</i>	25
4. <i>Métabolisme minéral.....</i>	25
b. <i>Au niveau des tissus cibles</i>	25
i. <i>Effets sur le foie.....</i>	25
ii. <i>Effets sur l'os.....</i>	26
iii. <i>Effets sur la mamelle</i>	26
c. <i>Au niveau de l'organisme</i>	27
i. <i>Effets sur la croissance</i>	27
ii. <i>Effets sur la cicatrisation</i>	27
iii. <i>Effets sur la production de lait</i>	28
iv. <i>Autres effets.....</i>	28
4- Hormone de croissance et dopage.....	29
a. <i>La GH recombinante.....</i>	29
i. <i>Fabrication.....</i>	29
ii. <i>Utilisation.....</i>	29
b. <i>Méthodes de détection.....</i>	31
i. <i>Méthodes indirectes.....</i>	31
1. <i>Les bio-essais</i>	31
2. <i>Les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) et radioimmunologiques (RIA).....</i>	32
ii. <i>Méthodes directes.....</i>	32
iii. <i>Méthodes de détection de seconds marqueurs</i>	32
1. <i>Les IGF et IGFBP</i>	32

2.	Les anticorps	33
3.	Autres marqueurs	34
iv.	Génomique	34
1.	Généralités	34
2.	Mesure de l'expression génique à l'aide de puces à ADN sur lames de verre	37
3.	La PCR en temps réel	45
II-	Deuxième partie : approche transcriptomique sur les leucocytes sanguins du cheval pour la détection de l'administration d'hormone de croissance recombinante équine	49
1-	Matériels et méthodes	50
a.	Présentation des chevaux	50
b.	Présentation d'EquiGen TM	51
c.	Conduite de l'expérimentation	52
d.	Doses et modalités d'administration	53
e.	Réalisation des prélèvements	54
i.	Temps de prélèvement	54
ii.	Modalités de prélèvement et de traitement des échantillons de sang	54
iii.	Modalités de prélèvement et traitement des échantillons d'urine	55
iv.	Devenir et usage des échantillons de plasma et d'urine	56
f.	Effets indésirables du produit administré : EquiGen TM	56
g.	Devenir et usage des échantillons d'ARNs	57
i.	Validation d'un mode opératoire de préparation des ARNs totaux leucocytaires équins	57
ii.	Validation de l'analyse en PCR quantitative sur ARNs totaux leucocytaires équins	61
h.	Conduite de l'analyse transcriptomique des ARNs leucocytaires	62
i.	Plan d'hybridation et stratégie employée	62
ii.	Choix des couples d'échantillons à hybrider	63
iii.	Déroulement des expériences	66
iv.	Analyse des données	66
2-	Résultats	68
a.	Contrôles qualité	68
b.	Gènes différentiellement exprimés dans le contexte de l'étude	70
c.	Résultats obtenus	72
i.	Filtres et sélection de gènes	72
ii.	Sélection de gènes différentiellement exprimés	72
d.	Conclusions sur les résultats de transcriptomique	76
e.	Utilisation de la PCR quantitative pour valider la pertinence des gènes candidats retenus et construire leur cinétique de réponse à l'hormone durant le protocole	77
3-	Discussion	78
	CONCLUSION	80
	ANNEXES :	81
	Annexe 1 : Journal officiel de la République Française Jeunesse et Sports	82
	Annexe 2 : Code des courses au galop. France Galop. 1 ^{er} Janvier 2010	86
	Annexe 3 : Aliment complet distribué aux chevaux	90
	Annexe 4 : Fiche individuelle de suivi zootechnique	91
	Annexe 5 : Fiche individuelle d'administration et de tolérance	92
	Annexe 6 : Fiche individuelle de prélèvement sanguin	93
	Annexe 7 : Fiche individuelle de prélèvement urinaire	94
	Annexe 8 : Protocole de préparation des ARN	95
	Annexe 9 : Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent)	101
	Annexe 10 : Protocole d'hybridation, de lavage et de lecture des arrays oligonucléotides 4x44K Agilent	103
	Annexe 11: Listes des spots déclarés différentiellement exprimés	113
	Références bibliographiques	129

INTRODUCTION

Le dopage a toujours été présent dans le sport. Il remonte aux premiers JO et est maintenu par le désir, toujours d'actualité, conséquence du désir de l'être humain, de gagner à tout prix, pour l'argent mais aussi pour la reconnaissance.

Les sports hippiques et équestres ne sont pas épargnés par le dopage, pour preuve les nombreux contrôles positifs lors des derniers Jeux Olympiques de Pékin. Il est donc nécessaire de mettre en place des contrôles lors des compétitions mais aussi lors des entraînements. Chaque année, une liste des substances prohibées est publiée par les différentes institutions hippiques : FFE, FEI, France Galop (Annexes 1 et 2, http://www.feicleansport.org/ProhibitedSubstancesList_Jan2010.pdf). L'hormone de croissance, appartenant au groupe des anabolisants, en fait naturellement partie. En effet, ces molécules sont susceptibles de stimuler la sécrétion endogène de différents facteurs tels que les anabolisants naturels ou de modifier certains processus complexes comme l'érythropoïèse ou la croissance osseuse et donc d'entraîner une amélioration des capacités sportives et ainsi des performances.

La mise en place sur le marché d'hormone de croissance recombinante équine a poussé les autorités hippiques à mettre au point des méthodes de détection de cette hormone afin d'enrayer un éventuel dopage. La détection de ces produits est compliquée par leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques : courte demi-vie, structure très proche du composé endogène. Plusieurs techniques ont été développées : détection quantitative par spectrométrie de masse, suivi d'évolution de facteurs de croissance comme l'IGF-1, de protéines de transport comme l'IGFBP-1 et l'IGFBP-3 ou de facteurs de croissance osseuse comme l'ostéocalcine. Actuellement, l'IGF-1 est utilisé comme biomarqueur de l'utilisation de GH, mais la durée et la spécificité de la réponse à l'IGF-1 ne sont pas considérées comme optimales.

L'hormone de croissance équine a été décrite comme étant impliquée dans la stimulation de la transcription d'un certain nombre de gènes dans les cellules cibles. Le projet a été mené par deux équipes de recherche, le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) et le laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'INRA de Toulouse, suite à l'appel d'offre du COST des Haras Nationaux en 2006. Il repose sur l'hypothèse de l'action de l'hormone de croissance recombinante équine sur le niveau d'expression des gènes dans les leucocytes circulants, cellules simples à collecter en routine, et de la détection de cette action sur une période supérieure à celle de la présence de l'hormone de croissance recombinante équine dans le sang.

Tout d'abord, cette thèse fait un état des lieux des connaissances actuelles concernant la définition et la biochimie de l'hormone de croissance, sa production par l'organisme, son mécanisme d'action et enfin sur les méthodes de détection chez le cheval. Ensuite, nous verrons la description des matériels et méthodes utilisés au cours de cette expérimentation pour mettre au point notre méthode indirecte de détection de l'administration frauduleuse d'hormone de croissance recombinante équine à des chevaux : l'utilisation de l'outil « puce à ADN » nous permettra de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés dans le cadre d'une exposition à l'hormone de croissance, après extraction et purification des ARNs totaux leucocytaires. Enfin, nous exposerons les résultats des recherches auxquelles nous avons été associées avec notamment le choix de gènes de haute pertinence permettant la réalisation de tests sur le terrain.

I- Première partie : un point sur les connaissances actuelles

1- Définition et biochimie de l'hormone de croissance

a. Structure de l'hormone de croissance

i. Structures primaire et secondaire

L'hormone de croissance équine est une hormone polypeptidique d'une seule chaîne de 190 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 22 kilodalton (Zakin et *al*, 1973 ; McDonald's 2003). Elle a été caractérisée dans les années 70 (Thomas et *al*, 1998).

D'origine protéique, elle est classée parmi les hormones hydrophiles (Martineau, 2003).

Elle appartient à la super famille des hormones hématopoïétiques, qui comprend des hormones hypophysaires, comme la prolactine, le lactogène placentaire, et des hormones non hypophysaires, comme les interleukines 1-7, l'érythropoïétine, les facteurs de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage (GM-CSF). Les membres de cette famille ont la même structure tridimensionnelle, malgré des séquences différentes (Secchi et Borromeo, 1997).

Les molécules d'hormone de croissance possèdent chacune quatre cystéines, éléments de formation de ponts disulfures. Celles-ci sont situées à la même position dans différentes espèces dont le cheval, ce qui entraîne la formation des ponts disulfures entre les acides aminés 52-163 et 180-188 (Zakin et *al*, 1972 et 1976 ; Bailly Chouriberry, 2007).

La structure secondaire de l'hormone de croissance est de type « tout alpha » avec quatre hélices antiparallèles disposées en paquet d'hélices. Les deux premières hélices sont parallèles et disposées dans la direction « up-up » et les deux autres « down-down » (Secchi et Borromeo, 1997)

ii. Structures tertiaire et quaternaire

La structure tertiaire de l'hormone de croissance équine n'a toujours pas été décrite. Chez l'homme, elle est de type globulaire avec 4 hélices alpha et 2 ponts disulfures (De Groot, 1989).

Chez l'homme, l'hormone de croissance existe sous forme d'oligomères, mais cela n'a jamais été rapporté chez le cheval (Bailly-Chouriberry, 2007)

iii. Origine génétique et homologie

Chez l'homme, il existe deux variants de l'hormone de croissance : un de 22 kDa et un de 20 kDa qui correspond à la forme 22 kDa moins les acides aminés 32 à 46. La hGH présente une homologie de structure avec la somatomammotropine chorionique humaine (hCS), un peptide sécrétée pour la majeure partie par le placenta. En effet, 161 des 191 acides aminés de sa séquence sont dans la même position que ceux présents dans la hGH. Les ponts disulfures sont également dans des positions comparables. Cela signe une dérivation évolutive récente d'un précurseur commun à ces molécules. Malgré cela, la hCS n'a qu'un très faible potentiel de promotion de la croissance. La prolactine est un membre plus distant de la famille des hormones de croissance. Elle possède 199 acides aminés et un pont disulfure supplémentaire. De plus, seulement 16% de ses acides aminés sont dans une position identique à ceux de la hGH (De Groot, 1989).

Le gène de l'hormone de croissance appartient à une famille de plusieurs gènes qui dérivent de la duplication d'un gène ancestral unique (Secchi et Borromeo, 1997). Il se trouve sur le bras long du chromosome 17, où il est associé à une série de gènes similaires codant pour la CS et un gène codant pour un variant de la GH. Ce dernier (GH-V) diffère du gène normal (GH-N) pour 13 résidus et il est exprimé exclusivement par le placenta. Le gène de la prolactine se trouve sur le chromosome 6 (Strobl et Thomas, 1994).

Chez les mammifères non primates (bovins, équins, porcins,...), l'hormone de croissance semble être exprimée uniquement par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse. Chez les bovins, le gène codant pour l'hormone de croissance se trouve sur le chromosome 19q. Il est formé d'environ 1793 nucléotides disposés en 4 introns (A-D) et 5 exons (1-5) (Secchi et Borromeo, 1997). L'hormone de croissance est synthétisée sous forme d'une prohormone constituée d'un peptide signal, formé par les 25 premiers acides aminés codés par l'exon I et une partie de l'exon II, et de l'hormone mature circulante (De Groot, 1989).

Des alignements de séquences de la bGH avec celles d'autres espèces ont été réalisés par Secchi et Borromeo (Secchi et Borromeo, 1997). Cela a permis de montrer l'existence de fortes ressemblances entre espèces, renseignant ainsi sur les portions de séquences jouant un rôle essentiel dans l'activité biologique de l'hormone (tableau I-1).

Espèces	Nombre d'acides aminés	Nombre d'acides aminés identiques à bGH	Pourcentage d'homologie (%)
Homme	191	127	66,5
Cheval	190	170	89,5
Porc	190	173	90,6
Bovin	191	191	100
Chien	190	173	90,6

Tableau I-1 : Tableau d'homologie de séquence entre bGH et GH d'autres espèces en ne tenant compte que de l'isoforme majoritaire pour chaque espèce.

Dans la plupart des espèces, la GH est synthétisée et sécrétée par l'adénohypophyse sous de nombreuses formes. Cette hétérogénéité est due à de nombreux mécanismes post-traductionnels tels que la désamidation, l'acylation, la glycosylation, la phosphorylation, la protéolyse et l'agrégation. Chez le porc, en purifiant fortement de la pGH, on obtient 2 à 5 sous-fractions qui diffèrent seulement par leur point isoélectrique (Secchi et *al*, 2001). Chez le bovin, les résidus asparagine (N) et glutamine (Q) sur les positions 13, 140 et 148 sont désamidés en acide aspartique (D) et glutamique (Q) (Secchi et Borromeo, 1997).

b. Propriétés

i. Point isoélectrique

Le point isoélectrique de l'hormone de croissance équine se trouve entre 6,7 et 6,8 après électrophorèse sur gel à pH entre 5 et 8 (Condé et *al*, 1973).

ii. Caractère antigénique

L'hormone de croissance bovine possède 4 à 5 sites antigéniques majeurs (Secchi et Borromeo, 1997).

iii. Concentration plasmatique

La GH circule dans le plasma sous forme libre ou liée à des protéines de transport (GH-BP). Chez l'homme, il existe deux types de GH-BP : l'une à haute affinité (GHBP-1) et l'autre à faible affinité (GHBP-2) (Gaillard, 2000).

La quantification de la sécrétion physiologique de l'hGH peut s'envisager selon plusieurs approches : dosage du taux de base de hGH circulante dans le sang, calcul de la concentration intégrée nycthémerale de hGH, étude de la pulsatilité spontanée nycthémerale de hGH ou dosage des taux urinaires de hGH sur 24 heures. Chez les animaux, les concentrations physiologiques de GH sont obtenues par dosage du taux de GH libre circulant. Chez le cheval, la concentration plasmatique de la GH a été déterminée par essai radioimmunologique et par ELISA. Les valeurs trouvées diffèrent selon les auteurs et les méthodes, mais elles se situent en moyenne situées entre 1 et 10 ng/mL. Il n'y a pas de modification de la concentration plasmatique moyenne entre les races ni selon l'âge, mais on observe des différences dans les modalités de sécrétion de la GH entre 2 et 10 mois d'âge. Cela concerne le nombre de pulses de GH par 8 heures et l'intervalle entre ces pulses. Il n'y a pas non plus de variations de cette concentration plasmatique entre chevaux dont la taille adulte est différente, par exemple entre le cheval miniature américain et le quarter horse (Thomas et al, 1998).

Chez l'homme, la concentration moyenne se trouve entre 3 et 6 ng/mL. La plupart des auteurs trouve une augmentation de la GH au cours de la puberté. Avec l'âge, la concentration de GH diminue. La réponse aux stimuli ainsi que les concentrations physiologiques de GH sont plus élevées chez la femme que chez l'homme. La demi-vie de l'hormone de croissance humaine est de 8 à 26 min (De Groot, 1989 ; Ganong et Jobin, 2003)

Ces valeurs de concentration classent l'hormone de croissance parmi les composés se trouvant à l'état de trace dans le plasma et posent donc le problème de sa détection dans le cadre de la lutte contre le dopage.

iv. Métabolisme

L'hormone de croissance est métabolisée par le foie et éliminée par voie urinaire (De Groot, 1989)

2- Production de la GH

a. Mécanismes de la production

i. Lieux de production

1. Production par l'hypophyse

L'hormone de croissance est produite au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, plus particulièrement par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse (De Groot, 1989 ; Mc Donald's, 2003).

Chez le cheval, l'hormone de croissance est naturellement sécrétée de façon pulsatile. Elle passe d'une concentration basale de 1 à 2 ng/mL jusqu'à un pic de 50 ng/mL et redescend aux valeurs basales en moins de 3 heures (Christensen et *al*, 1997, Thomas et *al*, 1998 Borromeo et *al*, 2007). Ces sécrétions reviennent entre 2 et 5 fois sur 24 heures (Thompson et *al*, 1992). La demi-vie plasmatique de la GH est très courte, de l'ordre de 15 minutes (Hindmarch et *al*, 1989).

Chez l'homme, les pics ont lieu toutes les 3 à 4 heures. La magnitude des pics varie selon les individus entre 10 et 50 ng/mL (De Groot, 1989).

2. Autres sites de production

L'hormone de croissance chez l'homme est également produite par l'hippocampe (Donahue, 2006). Chez le cheval, il semble que l'hypophyse soit le seul site de production d'hormone de croissance.

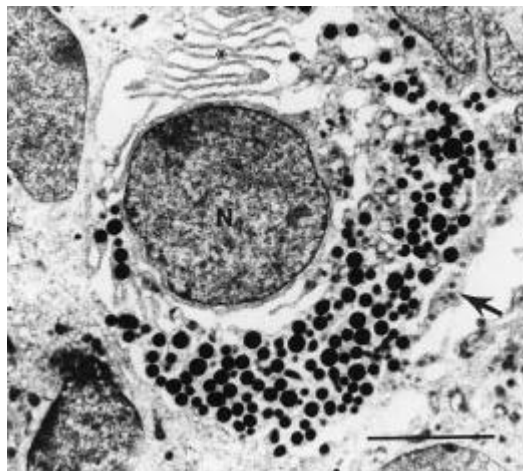
ii. Aspect cellulaire

Chez l'homme, elle est contenue dans des granules sécrétoires de 350 à 500 nm de diamètre, colorés en orange au tétrachrome de Herlant, et représente 8 à 16 % du poids net de l'hypophyse (De Groot, 1989 ; Dellmann et *al*, 1987).

Chez le cheval, les cellules somatotropes sont des cellules de taille moyenne, contenant des granules sécrétoires uniformes, larges et denses. Le noyau est généralement excentré. Elles représentent 11 à 26 % du nombre total de cellules de l'hypophyse. Il existe également des cellules mammosomatotropes qui contiennent à la fois de la GH et de la

prolactine dans les mêmes granules sécrétoires. Elles sont difficilement distinguables des cellules lactotropes de type I, qui sécrètent de la prolactine, et constituent 6,5 à 16,5 % du nombre total de cellule de l'hypophyse (Rahmanian et *al*, 1997) (figure I-1). Ces cellules mammosomatotropes ont été décrites dans d'autres espèces telles que l'homme (Zimmerman et *al*, 1974 ; Mulchahey et *al*, 1988), le rat (Papka et *al*, 1986 ; Nikitovitch et *al*, 1987) et la vache (Fumagalli et *al*, 1985 ; Hashimoto et *al*, 1987).

Des études ont montré que les lactotropes et les somatotropes peuvent s'interconvertir (Stratmann et *al*, 1974 ; Boockfor et *al*, 1986 ; Porter et *al*, 1990) et que les cellules mammosomatotropes seraient un des intermédiaires de cette conversion, ce qui en fait un mécanisme physiologique de contrôle très important.



*Figure I-1: Tissu hypophysaire équin incorporé dans du LR Gold montrant une cellule somatotrope relativement bien préservée. Les petits granules dans la cellule adjacente (flèche) ont été marqués pour la prolactine (6nm immunogold), bien que les particules ne soient pas visibles à cette échelle. * = réticulum endoplasmique ; N = noyau. Echelle = 3µm (Rahmanian et *al*, 1997)*

b. Contrôle de la production

i. Rôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire

La régulation de cette sécrétion est assurée par des hormones hypothalamiques. L'hypothalamus amplifie les messages envoyés par le cortex en sécrétant des neurohormones véhiculées par les neurones hypothalamiques grâce à des granules de neurosécrétion qui vont s'accoler à la membrane axonale et libérer leur contenu. Le mécanisme de libération est

déclenché par une onde dépolarisante qui entraîne une entrée massive d'ions calcium, entraînant à son tour l'expulsion des granules et la libération des molécules hormonales.

Ces neurohormones sont la somatolibérine, ou GHRH, qui stimule la sécrétion de GH et la somatostatine, ou SIRH, qui l'inhibe.

La GHRH est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-hormone de 107 à 108 AA (Guillemin et *al*, 1984). Le gène de la GHRH est situé sur le chromosome 20 chez l'homme. Elle est constituée de 44 acides aminés, mais des formes actives sans les acides aminés terminaux 4 et 7 ont été isolées. L'activité biologique complète est localisée dans les 29 acides aminés N-terminaux. Les cellules contenant la GHRH prédominent dans la région arquée de l'hypothalamus, avec des terminaisons axoniques dans l'éminence médiane. Les médiateurs primaires de son action sont l'AMPc et le calcium. Elle agit au niveau des cellules somatotropes et stimule la translation et la transcription d'ARNm (De Groot, 1989 ; Idelman, 2000).

La SIRH est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-somatostatine de 119 AA (Goodman et *al*, 1980). La forme active est constituée de 28 acides aminés. Elle se trouve principalement dans la région périventriculaire antérieure de l'hypothalamus, mais également dans les cellules delta du pancréas et de l'intestin et dans de nombreuses régions du système nerveux. La SIRH possède un récepteur situé à la surface des cellules somatotropes. L'hormone liée à son récepteur subit une internalisation. Son mécanisme implique un couplage inhibiteur de la synthèse d'AMPc, avec une inhibition de l'entrée des ions calcium et potassium par les canaux voltage-dépendants. Elle inhibe également la sécrétion de TSH, du glucagon, de l'insuline et des hormones du gros intestin (De Groot, 1989 ; Idelman, 2000).

ii. Rétrocontrôle

La régularisation de la sécrétion de la GH s'effectue essentiellement par rétrocontrôle négatif.

La sécrétion pulsatile de GH est due à un équilibre entre la sécrétion de GHRH et celle de SIRH. La GH inhibe sa propre sécrétion au niveau hypophysaire et la sécrétion de GHRH au niveau hypothalamique (Mc Donald's, 2003).

Les Insuline-like Growth Factor (IGF) interviennent également dans le rétrocontrôle négatif de la sécrétion de GH. Il en existe trois formes dont l'IGF-1 qui inhibe la sécrétion de somatolibérine et stimule la sécrétion de somatostatine (De Groot, 1989) (figure I-2).

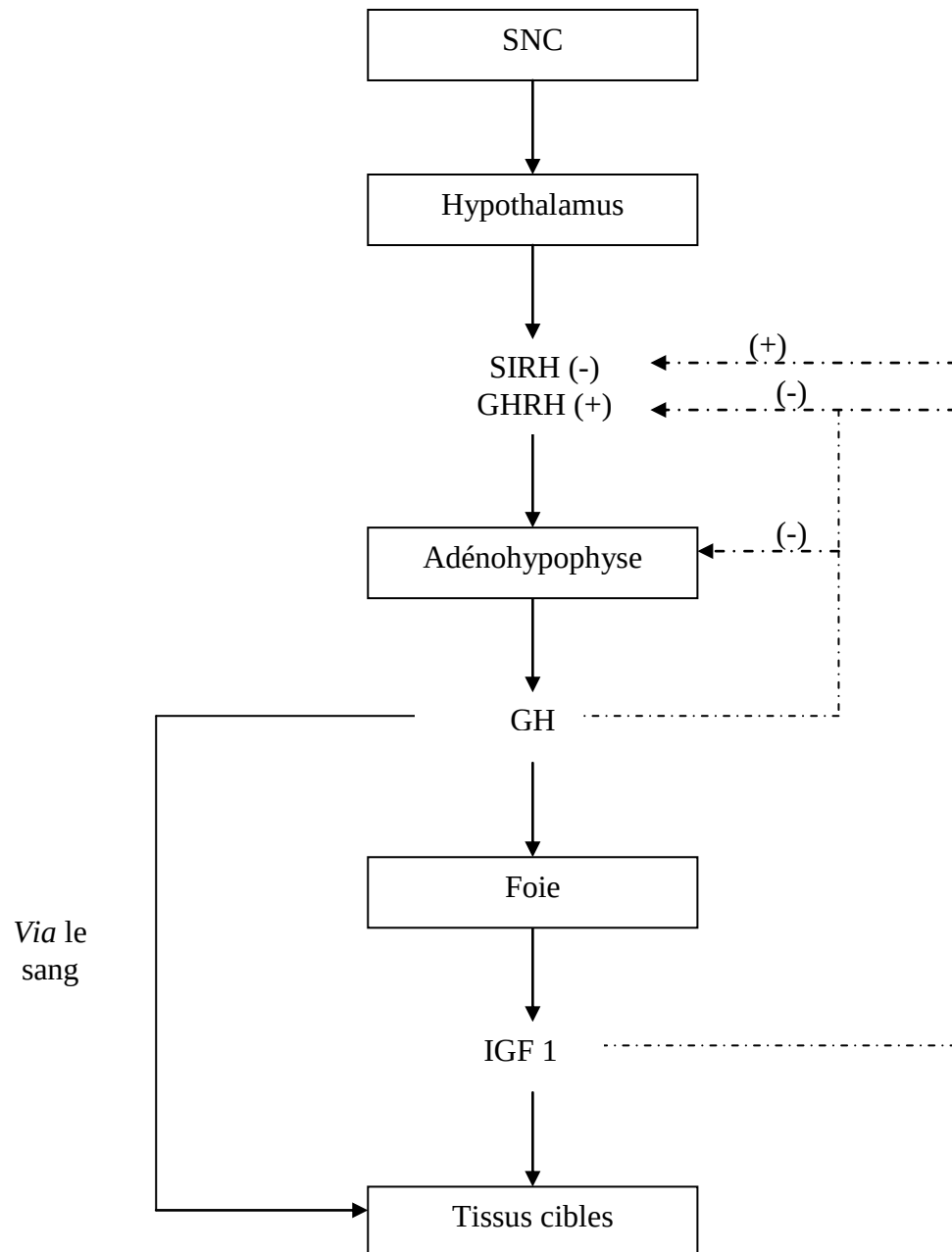


Figure I-2: Schéma de représentation de l'axe somatotrope (Bailly-Chouriberry, 2007)

iii. Facteurs influençant la production

1. Facteurs stimulants

La sécrétion de GH est stimulée entre autres par l'hypoglycémie, le sommeil profond, le stress et l'exercice (Ferguson, 1995). La concentration plasmatique de GH augmente fortement entre 1 à 3 heures après le début du sommeil (De Groot, 1989). La sécrétion de GH est également augmentée par l'administration d'acides aminés, principalement l'arginine et la leucine.

Chez les animaux soumis au stress, il y a augmentation de la sécrétion de GH par la voie dopaminergique qui intervient au niveau hypothalamique en modifiant la sécrétion de GHRH et SIRH (Peronnin, 1990).

L'expression des gènes de la GH est augmentée par les hormones thyroïdiennes, notamment par T3, et par les corticostéroïdes. Cependant, à fortes concentrations, ces derniers freinent cette sécrétion (De Groot, 1989).

Le système noradrénergique stimule la libération de GH par l'intermédiaire de récepteurs α_2 en induisant la sécrétion de GHRH. D'ailleurs, l'injection d' α_2 agonistes comme la xylazine stimule la sécrétion de GH contrairement à l'injection d' α_2 antagonistes comme la yohimbine (Gauthier, 1991).

2. Facteurs inhibiteurs

Elle est inhibée notamment par l'hyperglycémie, la progestérone et les fortes concentrations de glucocorticoïdes (Ferguson, 1995). Une augmentation des acides gras libres dans le sérum entraîne une diminution de la sécrétion de GH (De Groot, 1989).

Contrairement aux récepteurs α_2 , la stimulation des récepteurs β provoque une libération de SRIF et donc une baisse de la sécrétion de GH (Gauthier, 1991). Les antihistaminiques anti H1 et anti H2 sont aussi inhibiteurs de la sécrétion.

3- Action de la GH

a. Au niveau de la cellule cible

i. Mécanisme d'action au niveau cellulaire

1. Caractérisation du récepteur

De par sa structure, l'hormone de croissance doit, pour agir, se lier à un récepteur situé à la surface des cellules cibles. Celle-ci compte environ 10 000 récepteurs pour une hormone particulière. Il s'agit d'une glycoprotéine qui comprend une importante portion extracellulaire, un domaine transmembranaire et une portion cytoplasmique. Ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs à la cytokine comme le récepteur à la prolactine. (Ganong et Jobin, 2005).

Chez l'homme, le récepteur à la GH a été étudié sur une lignée de cellules lymphoïdes, les lymphocytes IM-9. Celui-ci possède une taille d'environ 109 kDa (De Groot, 1989).

2. Mécanisme

La GH a deux sites de liaison sur le récepteur. La fixation de la GH sur la première molécule du récepteur permet le recrutement d'une seconde sous-unité de récepteur, entraînant la formation d'un homodimère. Cette dimérisation est nécessaire pour que le récepteur soit activé (Ganong, 2005). La liaison de l'hormone de croissance provoque l'activation de l'adénylate cyclase, protéine membranaire dont le site actif est tourné vers le cytoplasme, qui convertit l'ATP en AMP cyclique. Celui-ci joue le rôle de second messenger et transmet l'information au cytoplasme. Lorsque la concentration extracellulaire de l'hormone diminue, le second messenger disparaît. En effet, l'hormone de croissance se lie de façon réversible à son récepteur et au moyen de liaisons faibles. De plus, l'AMPc est converti en un produit inactif par une autre enzyme (Campbell, 1995)

ii. Effets sur le métabolisme

1. Métabolisme lipidique

L'hormone de croissance est lipomobilisatrice. Elle favorise la libération d'acides gras non estérifiés par stimulation de l'activité lipasique des cellules. Ces acides gras sont eux-mêmes des inhibiteurs de la pénétration cellulaire du glucose. Ils vont ensuite être soit métabolisés afin de satisfaire les besoins énergétiques soit stockés en partie dans le foie et le rein (Peronnin, 1990 ; Gauthier, 1991).

2. Métabolisme protéique

La GH favorise la rétention azotée en augmentant la capture des acides aminés au niveau des tissus cibles. Dans le foie, la GH stimule le transfert intracellulaire des acides aminés et la synthèse d'ARN messenger, d'où l'augmentation de la synthèse protéique (Peronnin, 1990 ; Gauthier, 1991).

3. Métabolisme glucidique

La GH est une hormone hyperglycémiante. Elle stimule la glycogénolyse hépatique et diminue le transport transmembranaire du glucose dans le tissu adipeux. De plus, elle a un effet hyperinsulinémiant. Elle stimule indirectement les cellules β du pancréas, ce qui entraîne la sécrétion d'insuline, et perturbe la pénétration intracellulaire du glucose, ce qui conduit à un effet diabétogène (Gauthier, 1991 ; Mc Donald's, 2003).

4. Métabolisme minéral

L'hormone de croissance augmente l'absorption intestinale de calcium, diminue l'excrétion du sodium, du chlore, et du potassium et favorise la réabsorption rénale du phosphore par le tubule proximal (De Groot, 1989 ; Gauthier, 1991)

b. Au niveau des tissus cibles

i. Effets sur le foie

La GH interagit également avec les récepteurs membranaires des cellules du foie pour entraîner la libération de peptides stimulateurs de croissance appelés IGFs. Les IGF-1 et IGF-2 interviennent dans la croissance tissulaire et le développement des organes. L'IGF-1, aussi connu historiquement sous le nom de somatomédine C, est constitué de 70 aa et l'IGF-2 de 67

aa. Ils sont divisés en 4 domaines. Les domaines B et A contiennent près de 50% des mêmes acides aminés que ceux présents dans les chaînes B et A de l'insuline. Le prépro IGF-1 est composé d'une séquence de 130 aa à laquelle s'ajoute un peptide signal de 25 aa et un peptide terminal de 35 aa. Le prépro IGF-2 est plus important, avec 180 aa, un peptide signal de 24 aa et un peptide terminal de 89 aa. Le gène de l'IGF-1 est localisé sur le bras long du chromosome 12, et celui de l'IGF-2 sur le bras court du chromosome 11. L'IGF-1 est un médiateur important de l'action de la GH et est produit par de nombreuses cellules, notamment celles du foie. Il exerce également un rétrocontrôle négatif sur l'adénohypophyse pour réguler la sécrétion de GH. Des modifications de la concentration sanguine d'IGF-1 interviennent dans plusieurs maladies. Il existe également des différences de concentration plasmatique de GH et d'IGF-1 selon la taille de l'animal ; ces concentrations étant plus élevées par exemple chez les chiens de grande taille. (De Groot, 1989 ; Mc Donald's, 2003). L'action des IGF au niveau cellulaire se fait par liaison à des récepteurs cellulaires spécifiques, de structures similaires aux récepteurs à insuline. L'un lie préférentiellement l'IGF-1, et l'autre l'IGF-2. Leur distribution varie selon les tissus. Les IGFs circulent dans le sang en étant liés en majorité à des protéines spécifiques, les IGF-Binding Proteins (IGFBPs), au nombre de 6. Seule une faible fraction circule de façon libre. Ces IGFBP diffèrent selon leur affinité de liaison aux IGFs. Elles permettent également aux IGFs de persister plus longtemps dans le sang par rapport à la GH et de créer ainsi un réservoir d'IGFs. Chez l'homme (Kicman et *al*, 1997) et le cheval (Popot et *al*, 2000 ; De Kock et *al*, 2001), les concentrations d'IGFBP-3 sont les plus affectées par un traitement à la GH. Effectivement, plus de 90% des IGF-1 circulants sont liés à l'IGFBP-3 (Dart et *al*, 2003).

ii. Effets sur l'os

La croissance des os longs se poursuit aussi longtemps que les cartilages de croissance épiphysaires sont ouverts (Mc Donald's, 2003). Au niveau du cartilage, les IGF stimulent le transport des acides aminés, la synthèse d'ARN, ADN et des protéines. Ils augmentent également la synthèse de chondroïtine sulfate et du collagène (De Groot, 1989).

iii. Effets sur la mamelle

La GH joue un rôle central dans la lactation. Elle stimule la croissance des acini mammaires et modifie le métabolisme lors de la lactation. Elle diminue également les pertes azotées urinaires afin de compenser celles occasionnées par la production laitière (Mc Donald's, 2003 ; Peronnin, 1990).

c. Au niveau de l'organisme

i. Effets sur la croissance

La GH est indispensable pour une croissance osseuse et viscérale normale ainsi que pour un développement harmonieux (expériences de greffe et d'hypophysiectomie) (Peronnin, 1990). Elle augmente simultanément les masses de tissus osseux et de tissus mous du corps. Les concentrations dans le sang de GH sont élevées lors de la croissance rapide dans de nombreuses espèces, incluant le bétail, les porcs et les volailles (Mc Donald's, 2003). Au niveau des muscles, elle diminue l'assimilation du glucose, augmente celle des acides aminés ainsi que la synthèse protéique. Elle agit aussi sur la croissance des principaux viscères (foie, rein, pancréas...) (Peronnin, 1990).

Les IGFs jouent également un rôle important dans la croissance. Des expériences d'administration en continu d'IGF-1 à des rats hypophysiectomisés entraîne une croissance corporelle semblable à celle obtenus avec une administration de GH. Ils ont une action mitogénique et l'IGF-1 a un effet majeur sur la différenciation cellulaire, notamment sur les cellules de Leydig (Chatelain et *al*, 1988) et les cellules de la granulosa ovarienne (Adashi et *al*, 1984 ; Gauthier, 1991).

ii. Effets sur la cicatrisation

La réparation des tissus après une blessure entraîne la synthèse de protéines, une dépendance de la GH et des facteurs de croissance associés, tels que l'IGF-1. Chez le rat, des études ont montré que la GH stimule la granulation tissulaire (Steenfos and Jansson, 1992) et que la GHRH augmente la force de cicatrisation (Garrel et *al*, 1991). Chez l'homme, la rhGH permet d'accélérer la cicatrisation des blessures chez les enfants atteints de brûlures cutanées importantes (Gilpin et *al*, 1994).

Chez le cheval, l'administration de GH par voie IM à une dose de 20 µg/kg PV pendant 21 jours n'entraîne pas de différence notable dans la cicatrisation d'une plaie cutanée située au niveau du poitrail par rapport aux chevaux non traités. Cependant, elle pourrait être intéressante à utiliser lors de lésions sur des régions faiblement vascularisées comme le bas du membre, ou alors sur des lésions très sévères, comme lors de résection lors de chirurgie de colique (Smith et *al*, 1999).

iii. Effets sur la production de lait

L'administration de rbGH à des vaches permet d'augmenter la production de lait de 2 à 6 kg/j de façon variable selon l'âge des vaches, leur stade de lactation et leur état nutritionnel, la dose de GH injectée et la forme de présentation de l'hormone (Machlin, 1973 ; Peel et *al*, 1981 ; Chilliard et *al*, 1998). Au total, la production laitière annuelle est augmentée de 10 à 30 %.

En plus d'augmenter la quantité de lait produite, elle augmente la quantité en matière grasse, en protéine et en lactose (Fronk et *al*, 1983).

iv. Autres effets

L'utilisation de la GH chez la jument âgée permet une meilleure condition corporelle ainsi qu'une amélioration de l'immunocompétence (Malinowski et *al*, 1997) mais n'augmente pas leurs capacités à l'effort (McKeever et *al*, 1998). Des études ont montré qu'elle n'avait aucun rôle sur les caractéristiques qualitatives de la semence chez l'étalon, ni sur la concentration de testostérone plasmatique (De Botton et *al*, 2007). Le traitement journalier de foals avec de la reGH sur un an à la dose recommandée (20 µg/kg PV) modifie les caractéristiques hormonales et métaboliques connues pour être affectées par celle-ci (concentration plasmatique d'IGF-1, concentration plasmatique en insuline,...) mais elle ne modifie pas les caractéristiques de croissance des animaux (poids vif, hauteur au garrot, longueur du corps, largeur du poitrail et de la croupe, circonférence du cœur, longueur de la tête, longueur et circonférence des canons antérieurs et postérieurs, épaisseur de la peau, taille des organes internes (rein, foie)...). Une dose plus élevée permettrait peut-être de stimuler la croissance chez les foals (Capshaw et *al*, 2001, Kulinski et *al*, 2002). L'administration par voie intramusculaire de reGH (10 µg/kg PV pendant 4 semaines puis 20 µg/kg PV pendant 5 semaines) à des yearlings n'améliore pas l'adaptation physiologique du tendon fléchisseur superficiel du doigt au stress de l'exercice (Gerard et *al*, 2005).

Chez l'homme, le traitement des personnes âgées avec de la GH entraîne une augmentation de la masse corporelle maigre, une diminution de la graisse et une augmentation de la masse musculaire (Nelson, 1995)

On observe fréquemment une augmentation de la croissance musculaire et des organes ainsi qu'une diminution du contenu graisseux chez les porcs et bovins traités à la GH (Klindt et *al*, 1992, Etherton et Bauman, 1998)

4- Hormone de croissance et dopage

a. La GH recombinante

i. Fabrication

La fabrication d'hormones par des procédés biotechnologiques de façon massive et en quasi innocuité s'est très vite imposée chez l'homme après contamination de lots de hGH extraites d'hypophyses par le prion de la maladie de Creutzfeld-Jacob dans plusieurs pays comme le Royaume-Uni, les Etats-Unis et la France. L'industrie pharmaceutique a ensuite rapidement mis sur le marché des spécialités d'hormones de croissance destinées à accroître la rentabilité en production animale chez les bovins, équins et porcins.

La technique de recombinaison de l'ADN consiste à introduire une copie du gène codant pour l'hormone de croissance soit dans un colibacille, soit dans des levures, soit dans certaines cellules animales en culture, qui vont alors produire de l'hormone de croissance synthétique.

Dans le cas de l'hormone de croissance humaine, le gène ne peut être synthétisé et il faut l'isoler à partir de cellules humaines. A partir de l'ARN messager extrait de tissus hypophysaires humains, on fabrique à l'aide d'une enzyme, la transcriptase reverse, une copie d'ADN complémentaire. La molécule d'ADN double brin est alors introduite dans la bactérie *Escherichia coli*. Elle produit jusqu'à 10% de ses protéines totales sous forme d'une hormone portant à son extrémité une méthionine (Idelman, 2000). Cette méthionine N-terminale n'altère pas l'activité biologique de l'hormone puisqu'elle se trouve loin des domaines de fixation aux récepteurs.

ii. Utilisation

Plusieurs hormones de croissance recombinantes sont disponibles sur le marché malgré les nombreuses polémiques qu'elles soulèvent concernant leur utilisation dans les espèces animales.

La Food and Drug Administration (FDA) autorise depuis 1993 l'utilisation de cette hormone et sa présence dans les produits laitiers. Une grande partie de la production industrielle de lait aux USA et au Mexique utilise l'hormone transgénique (recombinant

bovine somatotropine, rbST) produite et commercialisée par l'entreprise Monsanto. D'après plusieurs études, cette hormone aurait de nombreux effets négatifs sur la santé du bétail, mais également sur la santé humaine. En effet, elle serait un facteur cancérigène, particulièrement pour le cancer du sein, de la prostate et du colon. La rbST n'est pas autorisée dans l'Union Européenne, ni dans de nombreux autres pays tels que la Nouvelle Zélande, l'Australie. Depuis août 2009, face à la pression grandissante d'associations de consommateurs telles que l'OCA's millions against Monsanto campaign, les grandes entreprises de la filière ont dû annoncer qu'elles renonçaient à l'utilisation de cette hormone et que tous leurs produits seront complètement exempts d'rbST (Champion et *al*, 2000 ; Grobe et *al*, 1999).

Chez l'homme, le dopage à l'hormone de croissance est apparu dans les années 80. Etant indétectable, elle a été utilisée dans de nombreux sports : haltérophilie, cyclisme, natation, football américain, athlétisme, et elle est à l'origine de plusieurs scandales. Son utilisation permet d'améliorer l'anabolisme musculaire et la lipolyse, et donc les performances. Cependant, son utilisation entraîne de nombreux effets secondaires : acromégalie, réactions allergiques, effets diabétogènes, troubles graves de la glande thyroïde, hypertension artérielle (De Mondenard, 2004)

L'emploi des anabolisants est rarement justifié en thérapeutique équine chez des animaux en bonne santé. Il est éventuellement justifié dans des traitements à longue haleine d'animaux qui présentent des troubles osseux graves ou pour des animaux débilités, amaigris ou insuffisants rénaux dont on cherche à épargner ou à restaurer les bilans protéiques. Il est évident que ces animaux ne peuvent être soumis à un entraînement ni réaliser de performances sportives. L'emploi d'anabolisants et notamment d'hormone de croissance chez des chevaux à l'entraînement s'inscrit surtout dans une démarche frauduleuse de dopage. De plus, pour agir, ces composés doivent imprégner l'organisme en permanence : ils nécessitent donc des administrations régulières (Mc Donald's, 2003).

L'hormone de croissance est utilisée dans le dopage du cheval pour ses effets anabolisants supposés comme l'augmentation des masses musculaires. Cependant, administrée à des doses importantes, elle peut entraîner une ossification prématurée des cartilages de conjugaison qui peuvent aboutir à une diminution de la taille chez les jeunes sujets. Elle peut également entraîner chez ces individus des ruptures tendineuses et des fractures osseuses suite à l'augmentation des masses musculaires et à des efforts plus importants qu'ils ne devraient l'être à cet âge (Courtot, 1980). L'utilisation d'hormone de croissance est interdite par les instances des courses hippiques, par la FFE et la FEI (Annexes 1 et 2).

Des études ont été faites sur les effets de l'administration de GH hétérologue à des chevaux. Buonomo et son équipe ont notamment montré que la bGH et la pGH étaient biologiquement actives chez le cheval, malgré des réactions locales aux sites d'injection. Ces observations ont aussi été notées par l'équipe de De Kock (Buonomo et *al*, 1996 ; De Kock et *al*, 2001).

b. Méthodes de détection

Il existe plusieurs méthodes de détection de l'administration d'hormone de croissance recombinante :

- Indirectes : bio-essais, tests immunoenzymatiques (ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), tests radioimmunologiques (RIA : RadioImmunoAssay),
- Directes : par la spectrométrie de masse,
- Mise en évidence de biomarqueurs secondaires comme l'IGF-1, l'IGFBP-3 ou des anticorps anti-GH recombinante

Ces méthodes sont réalisées à partir d'échantillons de sang ou d'urine.

i. Méthodes indirectes

1. Les bio-essais

Ils mesurent l'effet généré par la fixation de la GH à son récepteur spécifique. Deux dosages biologiques réalisés *in vivo* ont été essentiellement utilisés. Il s'agit de la mesure du gain de poids de rats hypophysiectomisés (Marx et *al*, 1942) et de la mesure de l'augmentation de l'épaisseur du cartilage de conjugaison de l'épiphyse proximale du tibia de rat hypophysiectomisé suite à une exposition à la GH (Greenspan et *al*, 1949). La précision de ces tests n'est cependant pas satisfaisante car sujette à l'influence de nombreux facteurs extérieurs. Des bio essais *in vitro* ont alors été développés : un basé sur la réponse de lignées cellulaires immortelles (Nb2) d'un lymphome murin où on mesure l'augmentation d'activité proliférative des cellules, et un basé sur les cellules fibroblastiques de souris (3T3-F442A) où on mesure l'augmentation de la transformation des cellules fibroblastiques en adipocytes (Brook et Marshall, 1998). Toutes ces méthodes sont inutilisables dans le cadre du contrôle antidopage à la fois pour des raisons pratiques et pour leur manque de spécificité.

2. Les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) et radioimmunologiques (RIA)

Ces tests ont une sensibilité pouvant aller jusqu'à la détection de concentration de GH de 0,5 à 1 µg/L pour les plus performants. Le principe de ces méthodes correspond à une adsorption passive ou à une fixation covalente sur une plaque solide d'un anticorps spécifique qui sera exposé à un mélange contenant l'antigène à doser dans l'échantillon (non marqué) et l'antigène marqué (concentration connue). Il y a donc compétition entre les molécules d'antigène pour les sites de liaison de l'anticorps. La quantité d'antigène marqué qui se fixe est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon à doser.

Dans le cas de l'ELISA, le marquage est de type enzymatique et dans le cas du dosage par RIA, il est radio-isotopique (Male, 1999).

ii. Méthodes directes

Ces méthodes nécessitent de purifier préalablement les échantillons afin de distinguer GH et rGH.

Les molécules de GH peuvent être détectées de manière non spécifique par ultraviolet grâce à la présence d'acides aminés aromatiques dans la séquence de la protéine. Dans la littérature, on trouve différentes valeurs de longueur d'onde selon que l'on s'intéresse à la détection des peptides de la GH ou de la molécule entière. Il semble que les longueurs d'onde de 220, 278 et 280 nm sont les plus utilisées pour détecter les molécules de GH chez l'homme, le porc, le bovin et l'équin (Bailly-Chouriberry, 2007)

La spectrométrie de masse a été très largement utilisée pour l'étude de l'hormone de croissance (Secchi et Borromeo, 1997). Plus récemment, Bailly-Chouriberry a détecté dans le plasma de cheval la présence de reGH 48h après administration sous-cutanée (25 µg/kg) par LC-MS/MS. Cette méthode permet de détecter la reGH plasmatique à des concentrations très faibles, de l'ordre de 1-10 µg/L (Bailly-Chouriberry et al, 2008(b)).

iii. Méthodes de détection de seconds marqueurs

1. Les IGF et IGFBP

La sécrétion de ces facteurs n'est pas pulsatile et leurs concentrations sont plus ou moins constantes dans les conditions physiologiques normales (Thompson et al, 1992 ; Malinowski et al, 1996). De Kock et son équipe ont réalisé une base de données concernant les valeurs plasmatiques en IGF-1 chez le cheval (De Kock, 2000). Le dosage d'IGF-1 libre et d'IGFBP 3 par immuno-essais ou spectrométrie de masse dans le sérum permettent de

détecter les chevaux ayant été exposés à la reGH (Popot et *al*, 2000 ; De Kock et *al*, 2001). Les chevaux traités présentent une augmentation de la concentration plasmatique en IGF-1 et en IGFBP 3 (Julen Day et *al*, 1997 ; Popot et *al*, 2001) (figure I-3).

Ces conclusions ont également été observées chez l'homme (Kicman et *al*, 1997)

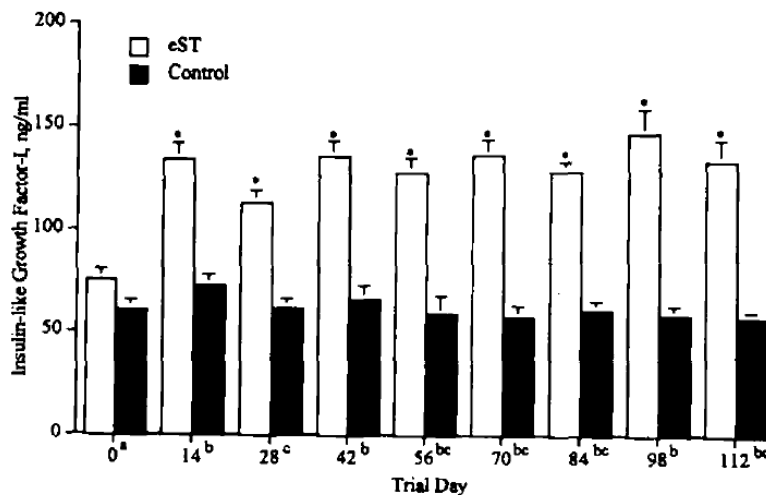


Figure I-3 :

Concentrations plasmatiques en IGF-1 chez des chevaux à l'entraînement

* sur le graphique indique une différence entre les chevaux traités(en blanc)(5mg les 5 premiers jours, puis 7,5mg les 14 suivant et 10mg pendant encore 93 jours, voie IM) et les contrôles(en noir) ($P < 0,01$). On observe une augmentation de la concentration chez les traités à partir de J14 et jusqu'à la fin de l'étude (Julen Day et *al*, 1997)

2. Les anticorps

L'administration de reGH entraîne, de par la présence d'une méthionine N-terminale, la formation d'anticorps anti-reGH. Ces anticorps ont été détectés par ELISA pendant plus de 5 mois chez deux chevaux traités à la reGH pendant 14 jours (18 $\mu\text{g/kg}$ la première semaine puis 25 $\mu\text{g/kg}$ la deuxième semaine) (Bailly-Chouriberry et *al*, 2008(a))

3. Autres marqueurs

L'ostéocalcine, marqueur majeur de la formation osseuse, est augmentée chez le cheval par un traitement à la GH (Julen Day et *al*, 1997). Celle-ci est un produit de l'activité des ostéoblastes qui sont stimulés par l'augmentation de l'IGF-1 plasmatique.

iv. Génomique

1. Généralités

Il s'agit d'une méthode de dépistage dite « indirecte » car basée sur la recherche des effets des composés et non sur leur identification. Les outils de génomique permettent d'analyser l'ensemble des effets d'un agent pharmacologique sur le niveau d'expression des gènes et ainsi de dépister la prise de produits illicites chez l'homme et l'animal mais également la présence d'anomalies chromosomiques.

Le terme transcriptome correspond à l'ensemble des transcrits présents dans une cellule à un état donné. Il existe donc autant de transcriptomes que de stades de développement des nombreuses cellules qui constituent l'organisme considéré. Il existe plusieurs méthodes d'analyses des transcriptomes, mais la plus répandue utilise les puces à ADN (figure I-4).



Figure I-4: Puce à ADN de la société AgilentTM : 44 000 oligo nucléotides déposés sur la surface de la lame permettent de tester une paire d'échantillon, marqués de manière différente, par hybridation compétitive

Le principe des puces à ADN consiste en une analyse par hybridations multiples simultanées. Elles sont composées de sondes ADN (oligonucléotides d'une dizaine de bases)

fixées sur un support solide (puce). Elles ont d'abord été conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées alors parfois « macroarrays » par oppositions aux « microarrays ») puis ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. La miniaturisation permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme. On distingue plusieurs types de puces selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation (Lin, 2004) (Tableau I-2).

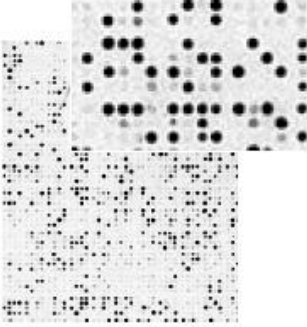
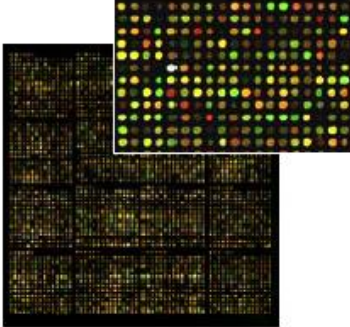
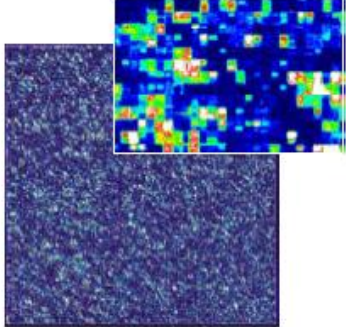
« Macroarray »	« Microarray spottée »	« GeneChips » de Affymetrix
 - support : membrane de nylon - taille des spots : 0,5-1mm - densité : quelques centaines de spots/cm² - sondes : produits de PCR - cibles : ADNc avec marquage radioactif au ³²P - principales applications : analyse de l'expression des gènes	 - support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : ~100µm - densité : 1000-10000 spots/cm² - sondes : produits de PCR ou oligonucléotides longs (30-70mers) - cibles : ADNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5 - principales applications : analyse de l'expression, ChIP-on-Chip, CGH-array	 - support : lame de verre à revêtement chimique - taille des spots : ~20µm - densité : jusqu'à 250000 spots/cm² - sondes : oligonucléotides courts (20-25 mers) synthétisés <i>in situ</i> - cibles : ARNc ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine-streptavidine - principales applications : analyse de l'expression, détection de marqueurs moléculaires

Tableau I-2 : Principaux types de puces à ADN (Lin, 2004)

Les ARNm sont extraits de l'échantillon à tester et sont marqués par introduction de molécules fluorescentes. Ils sont alors apportés en solution sur le support. La mise en présence des molécules marquées et des sondes conduit à la formation d'hybrides moléculaires. Après une étape de lavage, les hybridations effectives sont repérées grâce aux signaux émis par les marqueurs étiquetant la cible. On obtient ainsi une empreinte d'hybridation qui sera alors traitée par informatique et permettra d'identifier les transcrits ainsi que leur niveau d'expression.

Afin de valider la pertinence des gènes candidats comme futur outil d'analyse diagnostique et donc leur utilisation sur le terrain dans le cadre de la lutte anti-dopage, on fait appel à la PCR en temps réel. Elle correspond à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR conventionnelle) mais dont la mesure est effectuée en temps réel au cours de l'amplification de l'ADN complémentaire (copie exacte de l'ARNm). L'absence de différences statistiquement significatives entre différents laboratoires a été démontrée au cours de programmes tels que le Europe Against Cancer qui ont vérifiés la standardisation et le contrôle qualité des études par PCR en temps réel (Gabert et *al*, 2003 ; Van der Velden et *al*, 2004). La PCR en temps réel permet de tester quelques dizaines de gènes candidats mais pour un nombre illimité d'individus (Piquemal, 2008) (figure I-5). Elle se prête par contre mieux que les puces à ADN à la mesure de l'expression de quelques gènes sur de nombreux individus.

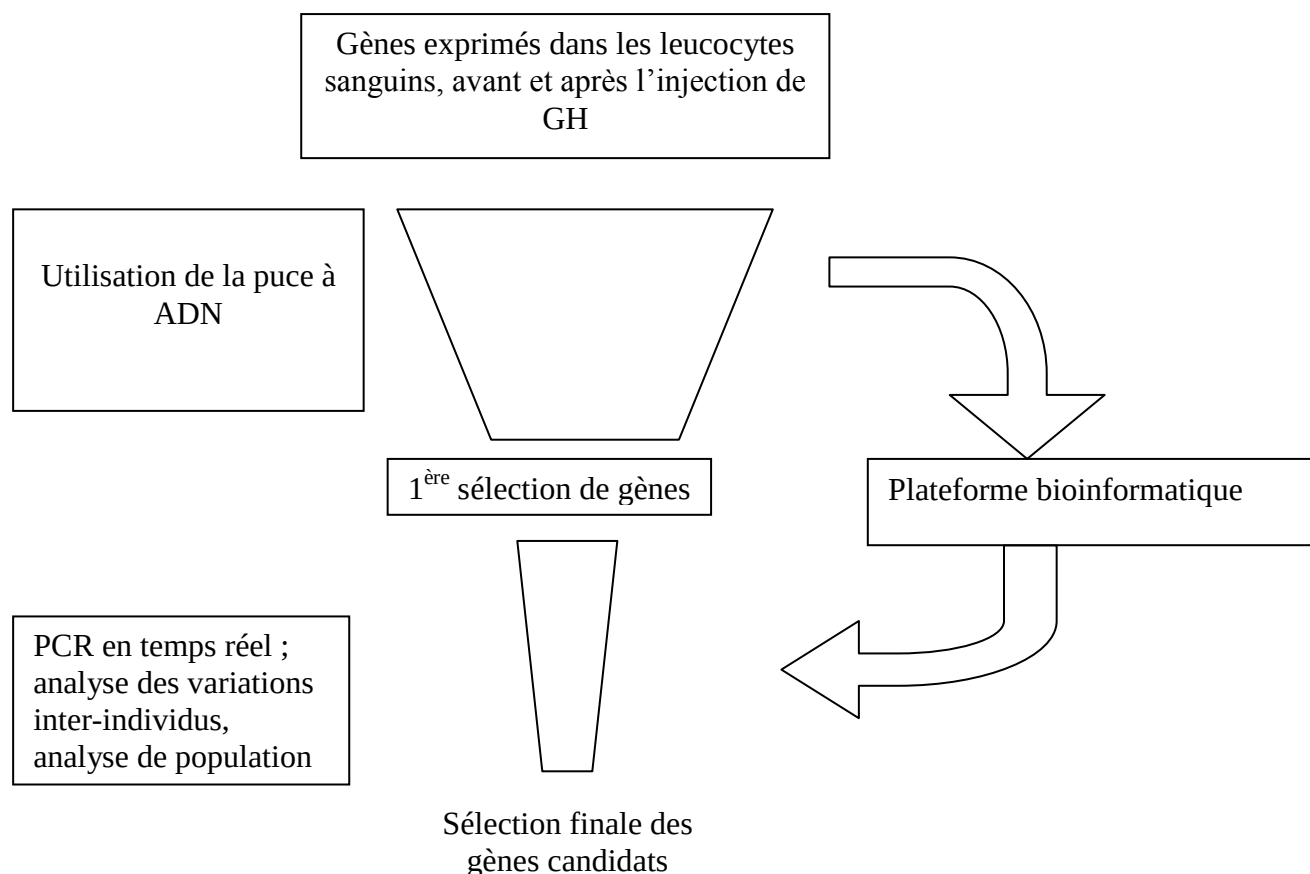


Figure I-5 :
Schéma de l'analyse expérimentale. L'ensemble des analyses permet de définir le nombre définitif et minimal des gènes à analyser pour confirmer de manière sûre l'administration de reGH à un cheval (Piquemal, 2008)

2. Mesure de l'expression génique à l'aide de puces à ADN sur lames de verre

Le principe des puces à ADN à double couleur est composé de différentes étapes. Les ARN à tester sont purifiés selon un protocole précis (Annexe 3). Ils sont ensuite marqués à l'aide de deux fluorophores, la cyanine 3 (Cy3) qui va émettre à une longueur d'onde située dans le vert, et la cyanine 5 (Cy5) qui va émettre à une longueur d'onde située dans le rouge (Annexe 9). Les deux échantillons à comparer sont alors hybridés sur la même puce qui va être lue aux deux longueurs d'onde correspondant au spectre d'émission des deux fluorophores utilisés. Ces deux images vont être fusionnées et analysées à l'aide d'un logiciel permettant de convertir l'image en valeurs numériques quantifiant l'expression des gènes (Lelandais, 2004)(figure I-6).

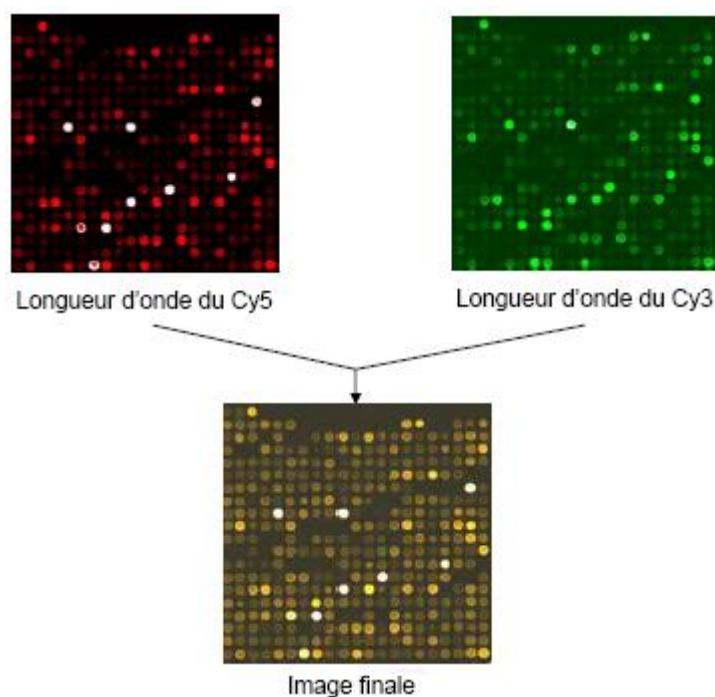


Figure I-6 :Exemple d'image finale obtenue après hybridation compétitive de deux échantillons à comparer sur une puce à ADN scannée et lue aux longueurs d'ondes correspondant aux spectres d'émissions des deux fluorophores utilisés (Lelandais, 2004)

L'analyse d'image se déroule en plusieurs étapes.

Tout d'abord, il faut localiser les spots sur la lame, ce qui permet d'assigner à chaque spot un identifiant de gène correct (figure I-7).

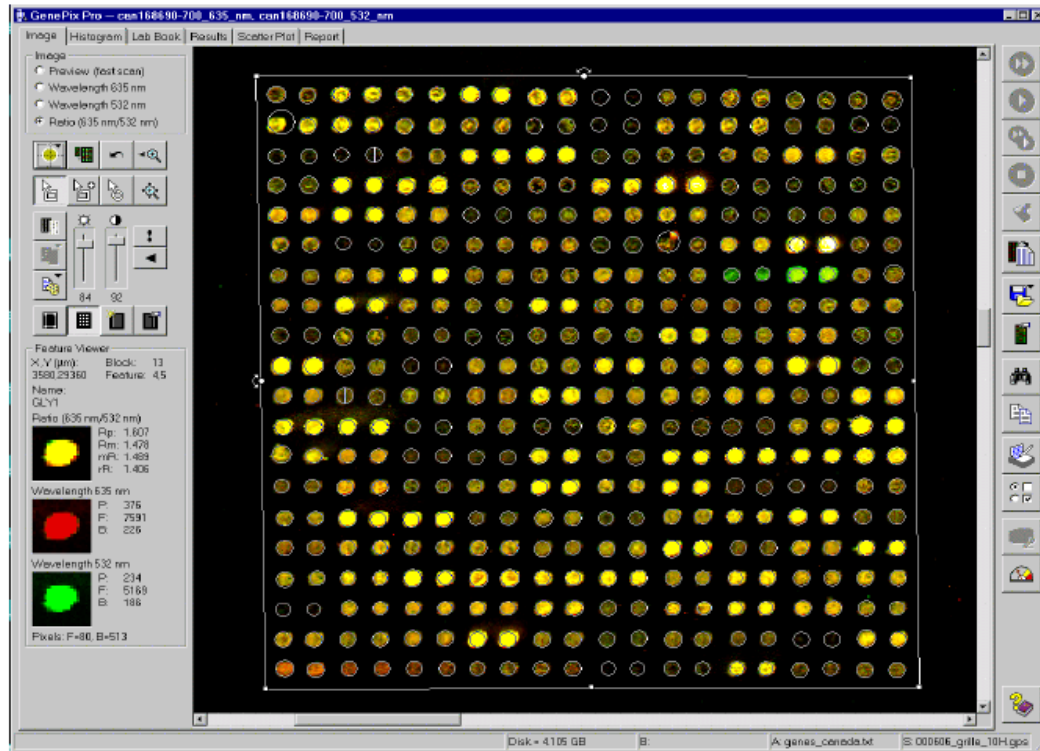


Figure I-7 : Exemple d'image obtenue après acquisition des données avec le logiciel GenePix Pro (Axon software)

Ensuite, pour chaque spot, il faut délimiter les pixels correspondant à la zone d'hybridation. Pour cela, différentes méthodes sont possibles : à l'aide de cercles à diamètre fixe, de cercles à diamètre variable ou par histogramme (Lelandais, 2004)(figure I-8).

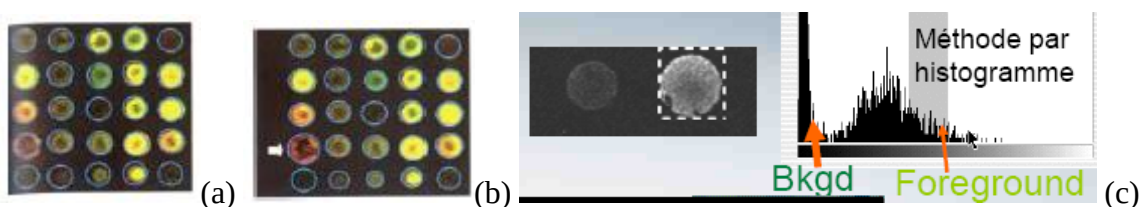


Figure I-8 : Les différentes méthodes de délimitation des spots : (a) cercle de diamètre fixe, (b) cercle de diamètre variable, (c) histogramme (Bkgd=background, bruit de fond ; Foreground=fluorescence spécifique d'hybridation)

Il faut après délimiter les pixels pour avoir une estimation du bruit de fond qui correspond à une fluorescence non spécifique (figure I-9).



Figure I-9 : Méthodes de mesure du bruit de fond selon les logiciels utilisés

On doit après calculer l'intensité globale de fluorescence du spot. Il existe plusieurs méthodes de calcul du niveau d'expression relatif de chaque gène : ratio des intensités moyennes, médianes, régression linéaire, plus ou moins sensibles.

Calcul du ratio par la formule suivante:

$$R/G = \text{Intensité Rouge} / \text{Intensité Verte}$$

Avec : Intensité = Intensité brute du spot – Intensité du bruit de fond

Si le ratio est supérieur à 1, le gène est plus exprimé dans l'échantillon marqué en rouge que dans celui marqué en vert et vice-versa (Figure I-10).

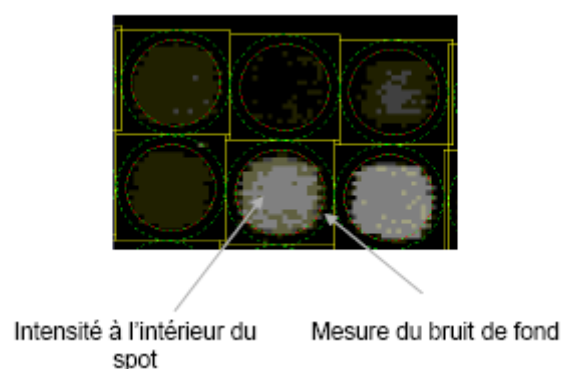


Figure I-10 : Illustration pour la mesure du ratio de l'intensité globale du spot

Pour manipuler et analyser les données, les ratios d'expression sont usuellement transformés dans une échelle logarithmique afin d'obtenir une distribution uniforme se rapprochant de la loi normale facilitant les analyses statistiques (figure I-11). Le logarithme en base 2 est celui qui est le plus souvent choisi.

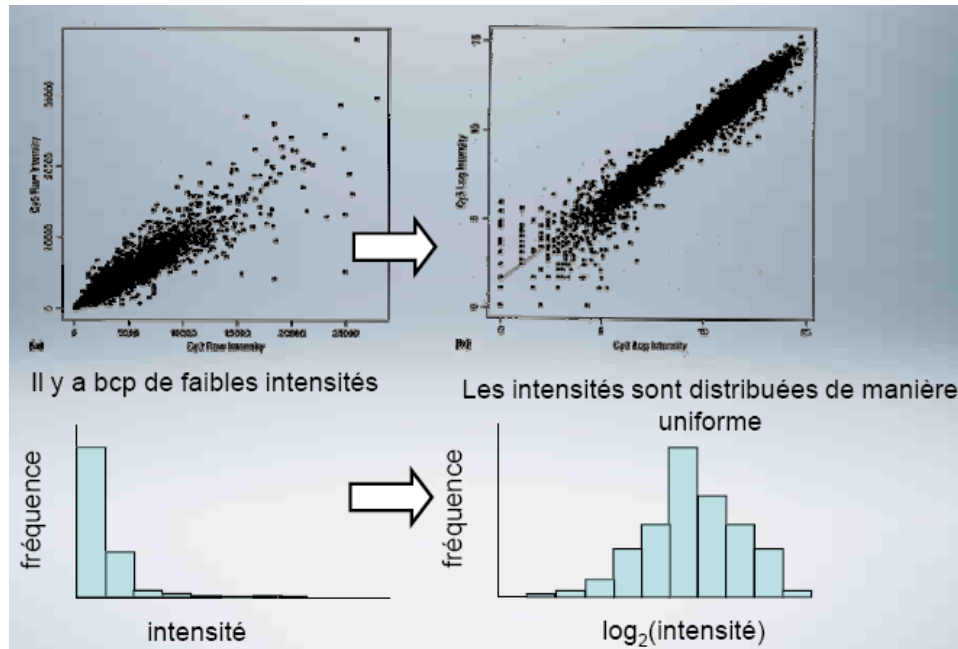


Figure I-11 : Exemple de transformation logarithmique

Les spots à l'intensité saturée ou ayant une différence trop faible entre le signal et le bruit de fond sont éliminés.

Les données sont alors représentées sous forme de MA-plot, avec :

$$M = \log(R/G) = \text{différence entre les intensités}$$

$$A = (\log R + \log G)/2 = \text{moyenne de l'intensité}$$

Cela permet une rotation du nuage de points (Lelandais, 2004) (figure I-12).

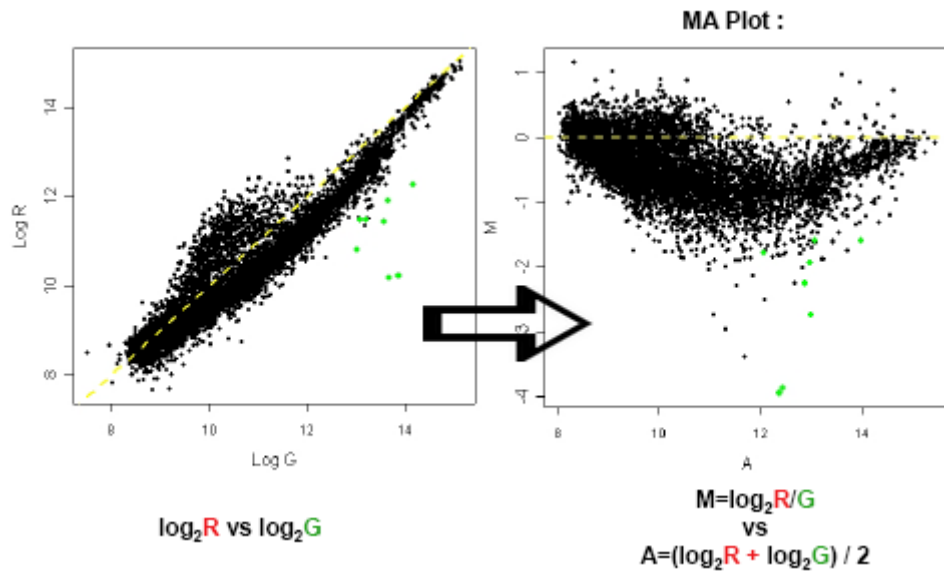


Figure I-12 : Exemple des deux types de représentation des données obtenues

Les données sont ensuite normalisées afin d'éliminer autant que possible les erreurs systématiques, c'est-à-dire celles qui ne représentent pas de réelle variation biologique entre les échantillons. On corrige ainsi les biais expérimentaux dépendant de l'intensité globale des spots, de la localisation des spots sur la puce, du type de sonde et du type de scanner. Il existe différentes méthodes de normalisation : par la moyenne ou la médiane, par régression linéaire, par régression linéaire locale ou méthode Loess (Locally Weighted Scatterplot Smoothing, Smyth et Speed, 2003) (figures I-13 et I-14). Cette dernière est celle utilisée dans la seconde partie. Elle correspond à une régression linéaire locale :

$$\log R/G \text{ devient } \log R/G - c(A) = \log R/(k(A)G)$$

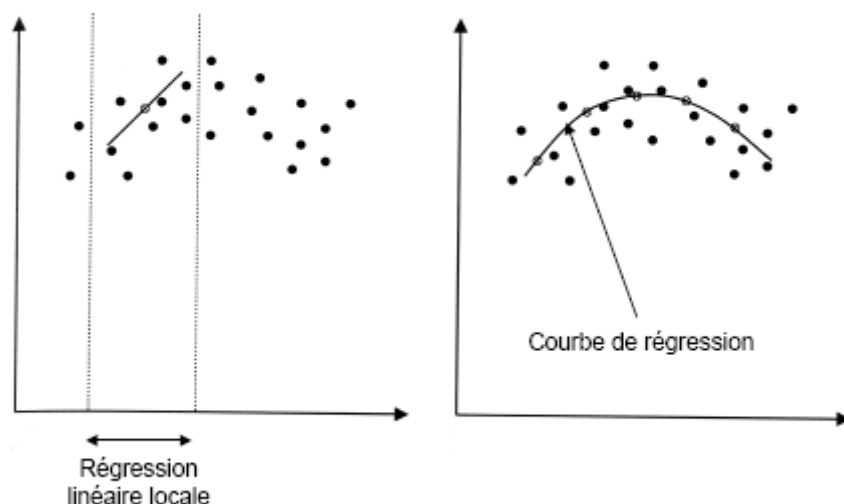


Figure I-13 : Principe de la normalisation de Loess

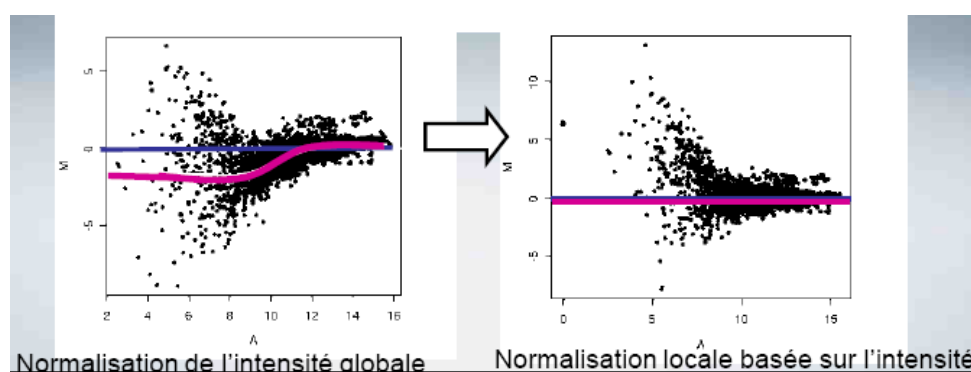


Figure I-14 : Résultat d'une normalisation par la méthode de Loess

Une fois ces étapes réalisées, les fichiers de données sont utilisables pour rechercher les gènes différentiellement exprimés dans une condition par rapport à une autre et aussi pour classer les gènes relativement à leurs mesures d'expression dans plusieurs expériences.

Pour identifier les gènes différentiellement exprimés entre les conditions hybridées sur la puce, ceux-ci sont considérés un à un afin de déterminer s'ils sont différentiellement exprimés ou non. La puce à ADN permet donc d'étudier des milliers de gènes en parallèle. Pour cela, un seuil C est arbitrairement choisi et les gènes dont la différence d'expression des intensités est supérieure à ce seuil sont sélectionnés. L'expression est différentielle si $\text{l'intensité (Cy5)} > C * \text{intensité (Cy3)}$ et inversement. Cependant, cette méthode présente plusieurs limites. En effet, il est difficile de choisir un seuil approprié, la variabilité globale des différences d'expression sur l'ensemble de la puce n'est pas prise en compte et enfin le niveau des intensités Cy3 et Cy5 n'est pas pris en compte. Il faut donc utiliser des méthodes plus élaborées qui reposent sur des approches statistiques. Pour obtenir des résultats plus fiables, la répétition de la même expérience est importante ; les valeurs moyennes étant moins variables que les valeurs individuelles. Cependant, il faut faire attention lorsque l'on effectue le même test statistique sur de nombreux gènes en parallèle car la probabilité d'erreur

augmente de manière considérable (Lin, 2004). Il faut réaliser une estimation du taux de faux positifs. Pour cela, on utilise la méthode SAM (Significance Analysis of Microarrays) ou la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). Celle-ci offre un contrôle fort du FDR (False Discovery Rate) qui contrôle la proportion de faux positifs.

$$\text{FDR} = \text{nombre de faux positifs} / \text{nombre de tests déclarés significatifs}$$

Les gènes sont ensuite classés relativement à leurs mesures d'expression dans plusieurs expériences. A chaque gène est associé un profil d'expression. On recherche les gènes dont les profils d'expression sont similaires au cours de l'expérience. La quantification du degré de ressemblance entre les profils pris deux à deux permet le calcul d'une distance. Les profils sont ensuite triés en fonction de la distance qui les sépare à l'aide de différentes méthodes de classification :

- Nuées dynamiques (K-means) : a pour objectif de partitionner l'espace en k classes, k connu. A partir d'une partition initiale, on améliore au fur et à mesure la partition de l'espace en minimisant la variance et en maximisant l'écart entre les classes (figure I-15).

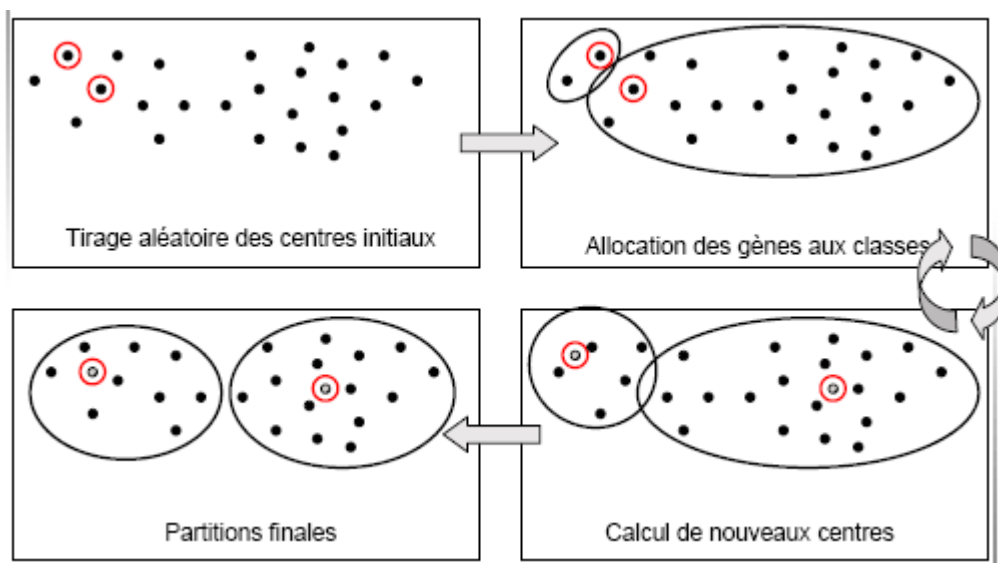


Figure I-15 : Les différentes étapes de la méthode k-means : permet d'obtenir des groupes (« clusters ») de gènes co-régulés dans les conditions étudiées sans préjuger de leur fonction

- Classification hiérarchique ascendante : fournit une hiérarchie de partition des gènes. Elle nécessite de définir une distance entre une nouvelle classe et les autres : single linkage (distance entre les plus proches paires), complete linkage (distance entre les paires les plus éloignées) ou average linkage (distance moyenne

entre toutes les paires ou distance depuis le centre de la classe)
(figure I-16)

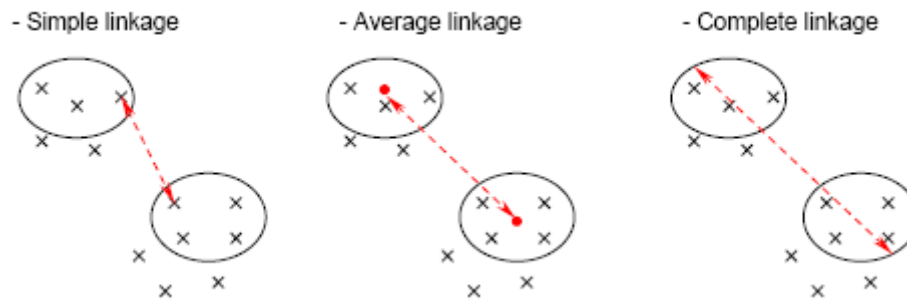


Figure I-16 : Méthodes de calcul de distance pour chaque cluster

En ordonnant ensuite les gènes de manière hiérarchique dans un dendrogramme à l'aide d'un logiciel, on obtient alors les profils des gènes sous forme d'une « carte d'expression » colorée ou heatmap (Lin, 2004) (figure I-17).

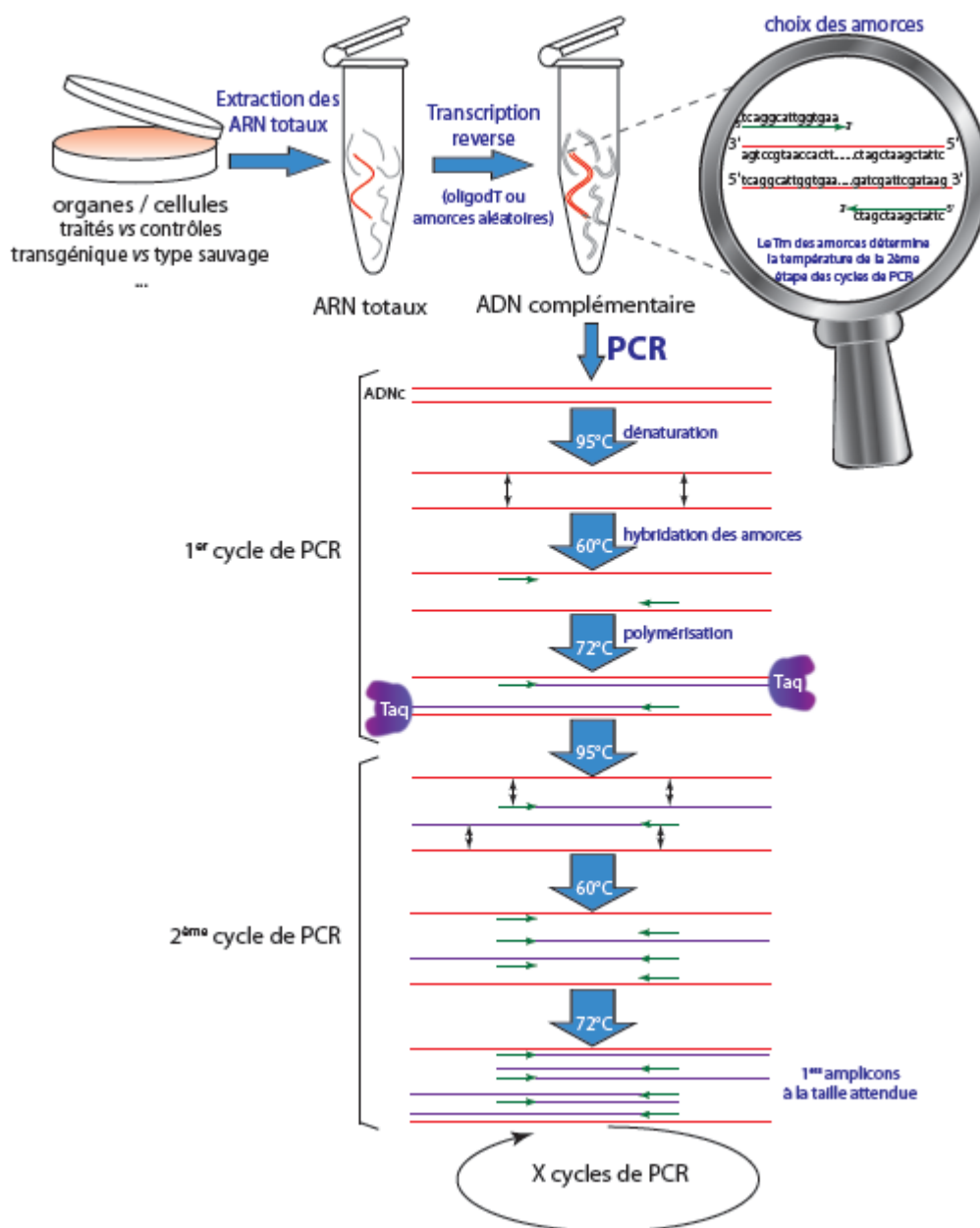


Figure I-18 : Principe général de la PCR

La partie haute du schéma illustre les étapes préliminaires de la PCR. En général, les cycles de PCR sont précédés d'une dénaturation de quelques minutes à 95°C. Un cycle est constitué de trois étapes : la dénaturation (95°C), l'hybridation des amorces (45-65°C à choisir en fonction de la température de fusion ou T_m des amorces) et la polymérisation (72°C). PCR : polymerase chain reaction, Taq : polymérase issue de *Thermophilus aquaticus*.

A partir du troisième cycle, si aucun réactif n'est limitant, la PCR aboutit à un doublement théorique à chaque cycle du nombre de copies de la séquence amplifiée. En réalité, des facteurs limitants de la réaction entrent en compte progressivement et en la croissance n'est réellement exponentielle que pendant un certain nombre de cycles (figure I-

19) Le taux d'amplification diminue ensuite pour devenir quasiment linéaire pendant plusieurs cycles. Il continue à décroître jusqu'à devenir nul, ce qui se traduit par une phase de plateau sans augmentation du nombre d'amplicons.

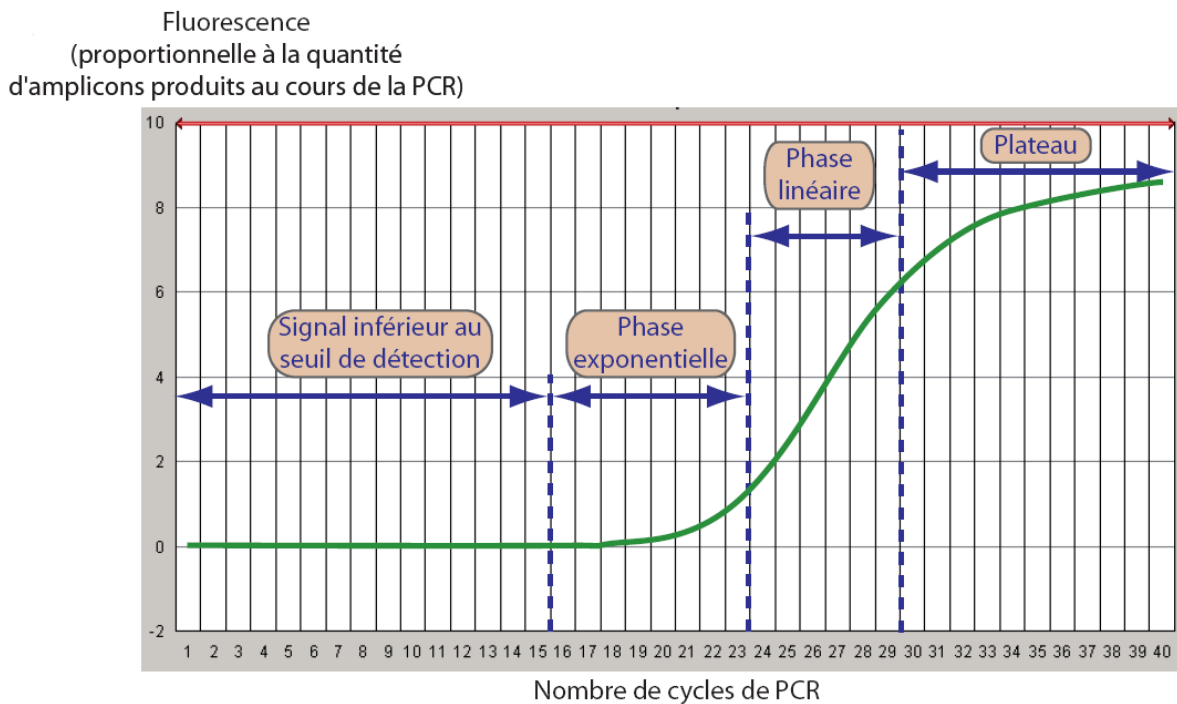


Figure I-19 : Courbe de PCR

Elle représente la quantité d'amplicons produits au cours des cycles de PCR

Le principe de base de la PCR en temps réel consiste à permettre une quantification de l'ADN produit dans le tube à chaque cycle et à générer une courbe de PCR pour chaque échantillon. Pour cela, plusieurs techniques ont été développées. La plus répandue consiste à utiliser un agent intercalant de l'ADN : le SYBR Green dont la fluorescence est très fortement augmentée lorsqu'il est intercalé entre les bases de l'ADN. La fluorescence mesurée dans chaque tube est proportionnelle à la quantité d'amplicons produits au cours de la PCR, ce qui permet de suivre l'évolution de l'amplification en temps réel. Les amorces des gènes jugés d'intérêt sont méticuleusement choisies afin d'éviter qu'elles ne s'hybrident sur elles mêmes ou l'une sur l'autre, formant ce qu'on appelle des dimères d'amorces. En répliquant une même PCR à partir du même échantillon d'ADNc et des mêmes réactifs, on constate que les courbes de PCR générées se superposent bien au niveau de la phase exponentielle mais commencent à diverger les unes des autres à partir de la phase linéaire. La phase exponentielle est donc l'étape de la PCR à laquelle une quantification fiable peut être réalisée. Dans le cadre de l'étude de l'expression d'un gène, une fois les courbes de PCR générées pour chaque échantillon, on définit à partir de ces courbes la zone dans laquelle la fluorescence est inférieure au seuil de détection (bruit de fond). Pour chaque courbe, la

moyenne des valeurs de fluorescence de cette zone est retranchée aux valeurs brutes, fournissant ainsi des courbes corrigées pour le bruit de fond. Ensuite, on fixe un seuil de fluorescence qui est choisi de manière à couper toutes les courbes de PCR au niveau de leur phase exponentielle. Ce seuil permet d'extraire de chaque courbe la valeur de CT (Cycle Threshold, cycle auquel la courbe croise le seuil). Celle-ci va être utilisée pour réaliser les calculs nécessaires à l'obtention de données correspondant à l'expression du gène d'intérêt.

Plusieurs options s'offrent au biologiste pour analyser les données de PCR en temps réel. Elles sont généralement basées sur des hypothèses dont il convient d'évaluer la vraisemblance et toutes supposent en particulier 1) que la fluorescence enregistrée est bien proportionnelle à la quantité d'amplicons produits et 2) que le seuil de fluorescence a été correctement fixé de manière à couper toutes les courbes de PCR au niveau de leur phase exponentielle. Alors que la seconde hypothèse relève d'une simple manipulation effectuée par l'utilisateur sur son logiciel d'analyse, la première hypothèse relève essentiellement d'un choix judicieux des amorces de PCR en SYBR Green. Il convient donc de ne pas sous-estimer l'importance du choix et de l'optimisation de la concentration des amorces lors du développement d'un dosage par PCR en temps réel (Martin, 2007).

Dans le cadre d'une lutte efficace contre le dopage à la reGH chez le cheval, cette méthode mérite d'être étudiée puisqu'elle constitue une approche novatrice, basée sur la recherche d'une preuve indirecte de l'administration d'une substance dopante et reconnue par les autorités hippiques et équestres.

II- Deuxième partie : approche transcriptomique sur les leucocytes sanguins du cheval pour la détection de l'administration d'hormone de croissance recombinante équine

Cette étude expérimentale a été réalisée dans le cadre d'un programme de recherche en partie financé par les Haras Nationaux et n'aurait pu aboutir sans la collaboration de plusieurs équipes : l'UMR 181 INRA-ENVT de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales à Toulouse représentée par le Pr Pierre-Louis Toutain, le LCH à Verrières le Buisson représenté par Yves Bonnaire et Marie-Agnès Popot, l'UR66 INRA de St Martin-du-Touch représenté par Thierry Pineau et le Centre Equestre de l'ENVT représenté par le Pr Pierre-Louis Toutain.

L'intégralité de la partie animale a été réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse de début août à fin octobre 2007.

L'objectif de cette étude était de travailler sur plusieurs axes afin de trouver de nouvelles méthodes de détection du dopage à l'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval.

Des échantillons de sang ont été fournis à l'INRA de St Martin-du-Touch afin de développer une méthode basée sur la génomique. L'objectif était de comparer l'expression génomique dans les leucocytes sanguins entre les chevaux traités et les chevaux du lot témoin. Tous les résultats actuellement obtenus vont donc être traités dans cette thèse.

Des échantillons d'urine et de plasma ont été fournis au LCH afin d'effectuer des études supplémentaires sur la méthode de détection par LC-MS/MS et sur le dosage des anticorps anti-reGH par ELISA mais aussi pour développer une nouvelle méthode de détection indirecte basée sur une approche métabolomique. Les résultats de cette partie de l'étude seront traités dans la thèse de Morgane Grall.

1- Matériels et méthodes

a. Présentation des chevaux

Seize chevaux de races Anglo-Arabe, Selle Français, ou d'origine inconnue, hongres et juments, âgés de 4 à 23 ans et appartenant à des propriétaires ou au centre équestre de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse-UMR 181 INRA-ENVT de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales ont été inclus dans le protocole. Les chevaux sont logés dans les conditions habituelles, au pré pour certains, au box pour d'autres. Les chevaux sont nourris au granulé (Energy DP Purina Legend, caractéristiques en annexe 3). La distribution des repas se fait en 2 ou 3 fois au cours de la journée, vers 8h, 12h et 19h, à raison d'approximativement 0,4 kg/100 kg PV de granulé par repas. Les chevaux disposent de paille de blé *ad libitum* et d'eau potable du réseau domestique à volonté, celle-ci ne contenant pas de contaminant répertorié. Les chevaux régulièrement montés au sein du club ont continué de l'être.

Les chevaux ont subi un examen clinique standardisé avant le début de l'essai et ont été déclarés apte pour l'essai. Aucun traitement médicamenteux y compris des vaccinations ne sera effectué au cours de l'essai. Les chevaux ont été pesés moins de 48h avant le début des administrations selon une procédure standardisée.

Chaque cheval a eu une feuille individuelle de suivi (annexe 4) sur laquelle ont été consignés quotidiennement les rations alimentaires (heure des repas et quantité donnée), l'activité sportive et tout événement à caractère zootechnique (problème de santé, ferrure...) susceptible d'interférer avec l'essai. Ces fiches de suivi ont ensuite été archivées dans des classeurs à l'UMR 181 selon une démarche qualité de type Bonnes Pratiques Cliniques (BPC).

Les individus ont été répartis en quatre lots expérimentaux (2 lots de 4 traités, 2 lots de 4 contrôles) de façon à gérer les possibles facteurs confondants que constituent le sexe et l'âge des individus. La composition des lots et les caractéristiques des individus sont reproduits dans le tableau suivant (tableau II-1).

N° codique	Nom	Sexe	Age (ans)	Poids (kg)	Monté	Logement	Traitement
01	Lago	H	15	575	Oui	Pré	GH
02	Isis	F	10	503	Oui	Pré	GH
03	Longo1	F	5	430	Non	Pré	GH
04	Laïus	H	8	575	Oui	Pré	GH
05	Dracon	H	16	594	Oui	Box	GH
06	Dardevil	H	16	550	Oui	Pré	GH
07	Haxius	H	12	470	Oui	Pré	GH
08	Nora	F	8	610	Oui	Pré	GH
11	Mirage	H	22	545	Oui	Pré	Contrôle
12	Hestia	F	12	475	Oui	Pré	Contrôle
13	Longo2	F	4	345	Non	Pré	Contrôle
14	Oscar	H	5	510	Oui	Pré	Contrôle
15	Gamin	H	13	574	Oui	Box	Contrôle
16	Milton	H	7	545	Oui	Box	Contrôle
17	Idefix	H	11	590	Oui	Box	Contrôle
18	Utopie	F	13	495	Oui	Pré	Contrôle

Tableau II-1 : Caractéristiques individuelles des chevaux utilisés pour l'essai et composition des lots expérimentaux

b. Présentation d'EquiGenTM

L'hormone de croissance testée a été l'EquiGenTM (méthionyl equine somatotropine) dosé à 10 mg par flacon, originellement de BresaGen Limited (Adelaide, Australia) et achetée par le Laboratoire des Courses Hippiques en Mars 2007 et acheminée à l'UMR 181. EquiGenTM Injection est une forme lyophilisée de somatotropine équine à laquelle on a rajouté de la méthionine ou hormone de croissance produite par une technologie d'ADN recombinant (figure II-1). Cette protéine est quasiment identique à la somatotropine équine naturellement produite par la glande pituitaire du cheval, à laquelle l'addition d'une méthionine facilite l'expression protéique. EquiGenTM n'est plus disponible sur le marché.

EquiGenTM a pour objectif de supplémer le niveau naturel d'hormone de croissance du cheval, ce qui peut être bénéfique chez les chevaux âgés, chez qui la concentration

d'hormone de croissance est en baisse, ou chez les chevaux qui ont besoin de modifier leur métabolisme ou d'augmenter leur renouvellement tissulaire.

Caractéristiques :

Origine : Bresagen Ltd ; Thebarton Australia

Conditions de conservation : au réfrigérateur (environ 6°C)

Présentation : flacon de 10 mg lyophilisé

Solvant : eau PPI Aguetant (2 mL par flacon d'Equigen)

Numéro de lot : V008-00403

Date de péremption : Juin 2009

Quantité disponible pour l'étude : 4 boîtes de 40 flacons à 10 mg soit 400 mg/boîte (1600 mg en tout). Ne pas jeter les petites quantités d'EquiGenTM restantes, congeler et garder à -20°C jusqu'au retour au LCH.

Des fractions aliquotes ont été conservées en vue d'un dosage de contrôle de la teneur en eGH de la forme pharmacologique.



Figure II-1 : Flacon d'EquiGenTM

c. Conduite de l'expérimentation

Durant les périodes nécessaires à la réalisation des traitements et des prélèvements, les chevaux étaient amenés dans un hangar dédié, muni de 6 box expérimentaux.

En raison de la lourdeur des préparations d'ARNs leucocytaires, 8 individus seulement étaient quotidiennement concernés. Deux sous-groupes de 8 individus sont donc entrés dans le protocole à un jour d'intervalle. Deux groupes de 4 (Chevaux [1, 2, 3, 4] avec chevaux [11, 12, 13, 14]) ont reçu leur première injection (hormone ou excipient) le 3 Août 2007 alors que les deux autres groupes (Chevaux [5, 6, 7, 8] avec chevaux [15, 16, 17, 18]) l'ont reçue le 4 Août 2007. Le même protocole a été appliqué à chaque demi-effectif en conservant le décalage d'une journée tout au long du protocole.

Le groupe traité a ainsi reçu une série d'injections d'eGH alors que le groupe contrôle a reçu 2 mL de sérum physiologique. En effet, le solvant étant de l'eau PPI Aguetant Lyon

pour éviter d'administrer une solution hypotonique et il a été décidé d'administrer le même volume sous forme de sérum physiologique.

d. Doses et modalités d'administration

La dose nominale administrée a été de 18 µg/kg de poids vif pour les 7 premières administrations et de 25 µg/kg de poids vif pour les 7 dernières administrations. A partir des doses nominales, les volumes à injecter ont été calculés en arrondissant les volumes (tableau II-2): ils ont été rapportés sur les feuilles d'administration.

Cheval	Poids (kg)	dose 18 µg/kg (µg)	Volume pour 18 µg/kg (mL)	volume final injecté (mL)	dose finale injectée (µg/kg)
Lago	575	10350	2,07	2	17,39
Isis	503	9054	1,81	2	19,88
Longo 1	430	7740	1,55	1,5	17,44
Laius	575	10350	2,07	2	17,39
Dracon	594	10692	2,14	2	16,84
Dardevil	550	9900	1,98	2	18,18
Haxius	470	8460	1,69	1,5	15,96
Nora	610	10980	2,2	2	16,39
					17,43
Cheval	Poids (kg)	dose 25 µg/kg (µg)	Volume pour 25 µg/kg (mL)	volume final injecté (mL)	dose finale injectée (µg/kg)
Lago	575	14376	2,88	3	26,1
Isis	503	12575	2,52	2,4	23,85
Longo 1	430	10750	2,15	2	23,25
Laius	575	14375	2,88	3	26,08
Dracon	594	14850	2,97	3	25,25
Dardevil	550	13750	2,75	3	27,27
Haxius	470	11750	2,35	2,4	25,53
Nora	610	15250	3,05	3	24,59
					25,24

Tableau II-2 : Posologies pour EquiGenTM administrées aux chevaux du groupe « traités »

Les administrations ont été réalisées par voie sous-cutanée dans une zone située dans le creux de l'épaule, en avant de la scapula selon une procédure standardisée. Les injections ont été réalisées alternativement à gauche et à droite à l'aide d'une aiguille et d'une seringue.

Les administrations ont été réalisées pendant 14 jours consécutifs avec la dose nominale de 18 µg/kg des jours 1 à 7 et la dose nominale de 25 µg/kg des jours 8 à 14. Les chevaux témoins ont suivi le même protocole d'administration mais avec du sérum physiologique.

Les chevaux ont été surveillés quotidiennement afin de détecter toute apparition de signes locaux d'inflammation aux sites d'injection ou tout trouble fonctionnel en lien potentiel avec les injections, notamment la raideur de l'encolure. L'épaisseur du pli de peau de l'encolure a été mesurée avant la première injection ainsi que tous les jours sur les deux sites d'injection avec un pied à coulisse digital (Digiroch, Luneville) selon une procédure standardisée. Chaque cheval a également une feuille de suivi où ont été notées les administrations et les observations concernant la tolérance à la reGH (annexe 5). En cas de réaction inflammatoire évidente ou d'intolérance marquée, l'essai a été arrêté.

e. Réalisation des prélèvements

Des prélèvements de sang et d'urine ont été effectués, avant, pendant et après, l'administration, de reGH pour les chevaux traités ou de sérum physiologique pour les chevaux témoins. Les jugulaires des chevaux ont été tondues des deux côtés.

i. Temps de prélèvement

Trois prélèvements témoins de sang ont été réalisés -48h, -24h et juste avant la première administration qui est notée J0. Les prélèvements de sang ont été effectués à J0 (à 10, 30, 60 min et à 2, 4 et 6h après l'injection) puis à J1, J3, J5, J7, J9, J11, J13 (dernier jour d'administration, à 10, 30, 60 min et à 2, 4, 6 et 8h après l'injection) puis à J14 (deux prélèvements à 24 et 32h après la dernière administration), J15 (deux prélèvements à 48 et 52h après la dernière administration), J16, J17, J19, J23, J30, J40, J50, J60, J70 et J80. Les administrations d'eGH ont été réalisées juste après les prélèvements de sang.

Deux prélèvements témoins d'urine ont été réalisés à -48h et -24h et ensuite à J1 (24h après la première administration), J3, J5, J7, J9, J11, J13 (après la dernière administration), J14, J15, J17, J19, J23, J30, J40, J50, J60, J70 et J80.

ii. Modalités de prélèvement et de traitement des échantillons de sang

Environ 60 mL de sang ont été systématiquement prélevés alternativement sur les deux jugulaires des animaux selon une procédure standardisée sur tubes avec héparinate de sodium pour les ARNs leucocytaires ou avec héparinate de lithium pour le plasma, référencés en annexe (annexe 8). Chaque prélèvement a été enregistré sur une feuille de suivi (annexe 6).

Les 60 mL de sang sont destinés à fournir 2 aliquotes de sang de 5 mL pour la préparation d'ARN, une fraction aliquote de 5 mL de plasma pour la métabonomique et 4 aliquotes de plasma de 5 mL pour les dosages de reGH conduits par le LCH.

Chaque tube de prélèvement de sang est identifié par le nom du cheval, du jour (J0 à J80) ainsi que de la date.

Pour le sang destiné à fournir du plasma, les prélèvements, stockés à 4°C, ont été centrifugés moins de 2h après le prélèvement pendant 10 min à 4000 g et le plasma a été récupéré en 4 fractions aliquotes d'environ 5 mL et congelé à -20°C jusqu'à analyse au LCH. Les tubes ont été identifiés de la façon suivante : 0 (placebo) ou 1 (traitement), le numéro codique du cheval (1 à 8 au sein de son groupe) et le rang du prélèvement de 0 à n ; de plus le nom du cheval a été marqué ainsi que la date du prélèvement. Tous les tubes d'un cheval ont été réunis dans une même poche et le tout stocké dans un congélateur dédié, un pour les témoins, l'autre pour les traités.

Pour le sang destiné à fournir les ARNs, les tubes ont été placés dans de la glace en attendant d'être traités dans les locaux de l'UR66 pour hémolyse, collecte des leucocytes et préparation des ARNs totaux avant congélation à -80°C. Les échantillons ont été traités dans les meilleurs délais au terme des prélèvements. Chaque point de la cinétique de prélèvement a conduit à deux échantillons d'ARNs leucocytaires totaux, entreposés dans deux congélateurs distincts, en attente de dosage, ajustement de concentration et transcription inverse en une seule opération portée sur la totalité des échantillons. En moyenne, la préparation des échantillons d'ARNs était achevée vers 15-16h pour les prélèvements effectués le matin (8h) et vers 23h-00h pour ceux effectués en soirée (20h).

Pour chaque animal il y a eu 25 échantillons d'ARNs avec une fréquence de prélèvement accrue (toutes les 12 heures) dans la période située entre 1 jour avant l'arrêt du traitement (J13) et 3 jours après cet arrêt (J17). Chaque échantillon est préparé selon le protocole validé (annexe 8) développé par l'équipe de Pharmacologie Moléculaire (UR66-INRA). Il comporte trois étapes clefs : 1) Hémolyse de l'échantillon sanguin (à 0°C) et collecte des leucocytes par centrifugation, 2) Lyse des leucocytes par action d'une solution d'isothiacinate de guanidine, 3) Collecte des ARNs par chromatographie d'affinité. Le même protocole est réalisé pour tous les échantillons et effectué sur les échantillons frais.

iii. Modalités de prélèvement et traitement des échantillons d'urine

Pour l'urine, les prélèvements des hongres ont été obtenus par miction spontanée, avant ou après injection d'eGH, grâce à la pose d'urinaux une fois les chevaux introduits dans les box de prélèvement, vers 8h du matin. Pour les juments, les urines ont été obtenues soit

par miction spontanée après introduction dans les box de prélèvement, soit par sondage urinaire (sonde gastro-duodénale de type Levin, L125 21FR, Vygon, Ecoven France) selon la procédure standardisée. L'heure de miction a été notée.

Ce volume d'environ 250 mL d'urine a été réparti en 4 fractions aliquotes de 30 mL dans des pots fournis par le LCH et utilisés en routine dans le contrôle antidopage. Le pH des urines a été mesuré avant les administrations de l'eGH et après la dernière administration. Chaque pot a été identifié par le nom du cheval et du jour de prélèvement (de J-2 à J80) et la date du prélèvement. Le même codage que pour le plasma a été utilisé pour identifier en plus les pots d'urine. Ceux-ci ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à analyse par le LCH. L'un des pots a été conservé pour archivage à l'UMR181.

iv. Devenir et usage des échantillons de plasma et d'urine

Les échantillons de plasma et d'urine ont été répartis sur les sites de l'ENVT (UMR 181, Laboratoire de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales, 1/3 des échantillons) et le Laboratoire des Courses Hippiques de Verrières-le-Buisson (2/3 des échantillons). Même si ceux-ci n'étaient pas indispensables pour l'exploration transcriptomique de la réponse à l'hormone de croissance chez le cheval, ils constituent un capital d'information non négligeable si nous souhaitons corrélérer ultérieurement une réponse transcriptionnelle à des cinétiques plasmatique et urinaire de teneur en hormone ou de ses métabolites, ou à des cinétiques d'apparition et de persistance des anticorps naturel dirigés contre cette hormone recombinante.

f. Effets indésirables du produit administré : EquiGenTM

D'après la notice, des effets indésirables peuvent être reportés : 1) une réaction au point d'injection, 2) un effet diabétogène léger, 3) une léthargie modérée (notice APVMA-Approval N°55291/0902).

Dans les 72 heures suivant la première injection, des signes évidents d'intolérance sont apparus aux sites d'injection sous la forme de placards inflammatoires fortement douloureux, de la surface d'une paume de main chez 5 des 8 individus traités. Après consultation et pour des raisons éthiques, les administrations d'hormone aux individus les plus affectés, Dardevil et Dracon, ont été interrompues respectivement les 7 et 9 Août 2007, au moment de leur 4^{ème} et 6^{ème} injection. Les autres individus ont continué à recevoir quotidiennement leurs injections, en essayant de s'éloigner un peu de la zone douloureuse. Chez Isis, l'inflammation au site d'injection s'est accompagnée d'un œdème des antérieurs. Quand le toucher de la peau

était trop douloureux, la mesure de l'épaisseur du pli de peau n'a pas été effectuée. L'état général des cinq individus affectés par le traitement s'est dégradé. Ceux-ci étaient apathiques et essayaient de limiter au maximum tout contact au niveau de leurs épaules. La prise alimentaire au sol est devenue un peu problématique mais les chevaux n'avaient pas perdu l'appétit.

Un retour à la normale a été progressivement constaté à partir d'un pic de symptomatologie estimé à J5-J6 suivant l'injection initiale pour les cinq individus concernés (2 en arrêt de traitement et 3 en poursuite de traitement).

Les prélèvements de sang et d'urine ont été poursuivis pour Dardevil et Dracon, malgré l'arrêt des injections d'eGH. En effet, même s'ils n'apportaient plus d'information dans le cadre du protocole (14 jours d'administration), ils pouvaient éventuellement être illustratifs d'une cinétique de décroissance d'hormone au terme d'une administration plus courte d'eGH. De ce fait, le protocole a été achevé avec 6 individus dans le lot « traités ».

Parallèlement, nous avons eu à déplorer la perte d'Hestia le 18 Août 2007, euthanasiée suite à des coliques et à une déchirure de l'estomac, sans lien avec son statut d'individu « contrôle ». De ce fait, à partir de J15, notre protocole n'a compté que 7 individus « contrôles ».

g. Devenir et usage des échantillons d'ARNs

i. Validation d'un mode opératoire de préparation des ARNs totaux leucocytaires équins

Le protocole complet est porté en annexe 3. Les expérimentations ont été conduites au Laboratoire INRA de Pharmacologie et Toxicologie (UR66).

La méthode retenue permet de concentrer les leucocytes par centrifugation après hémolyse provoquée. Pour la purification des ARNs proprement dite, une lyse leucocytaire a été réalisée avec le réactif commercial TrizolTM (Invitrogen©) suivie d'une purification sur micro colonne d'affinité abondamment rincée avant élution des ARNs (PureLinkTM Total RNA Purification System).

La qualité des ARNs totaux extraits et le rendement de préparation ont ensuite été testés via les équipements de la plateforme BioPuces du Génomètre-Toulouse par l'équipe de l'INRA. L'intégrité des préparations d'ARNs totaux a été testée par électrophorèse capillaire en gel en utilisant les mini puces d'électrophorèse adaptées à l'appareil BioAnalyzerTM de marque AgilentTM.

Les solutions d'ARNs extraits ont été entreposés dans deux sites distincts, à -80°C, au Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie (UR66-INRA, Toulouse).

Elles ont eu deux usages :

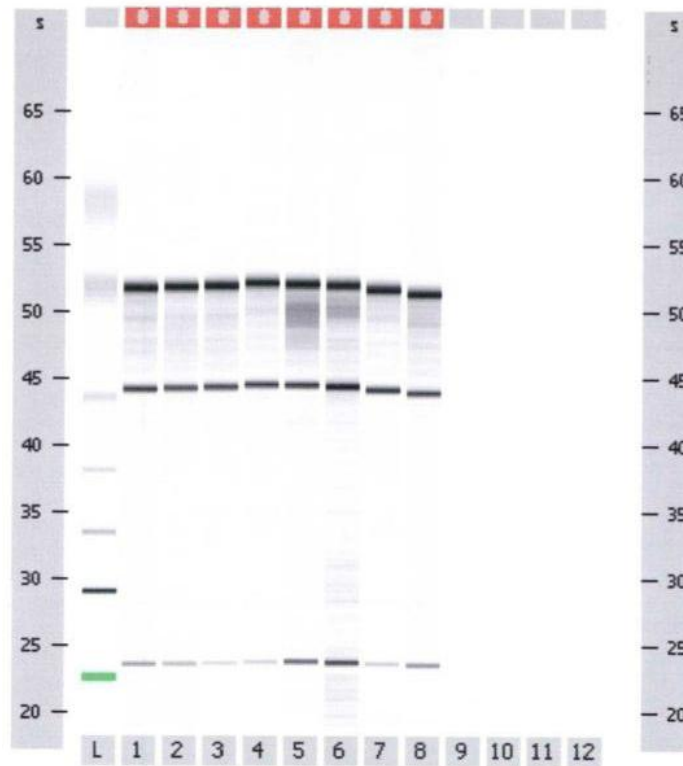
1] Un marquage fluorescent pour une partie des échantillons permettant de réaliser des hybridations compétitives sur puces à ADN pangénomiques de marque Agilent™.

2] Une rétrotranscription pour chacun des échantillons pour produire de la solution d'ADNc correspondante, utilisée ensuite comme matrice pour des analyses de PCR quantitative permettant de composer, gène d'intérêt par gène d'intérêt, le profil cinétique d'expression du transcrit durant toute la durée de l'expérimentation.

Ces ARNs ont donc ensuite été utilisés en situation afin de les qualifier pour le marquage, ce qui est réalisé avant toute hybridation sur puce à ADN. L'expérience des scientifiques de l'INRA a prouvé qu'un ARN donnant de bons résultats d'amplification en PCR quantitative présente effectivement le profil de qualité recherché. C'est donc cette « épreuve fonctionnelle » qui a été réalisée afin de valider le mode de préparation des ARNs totaux équins.

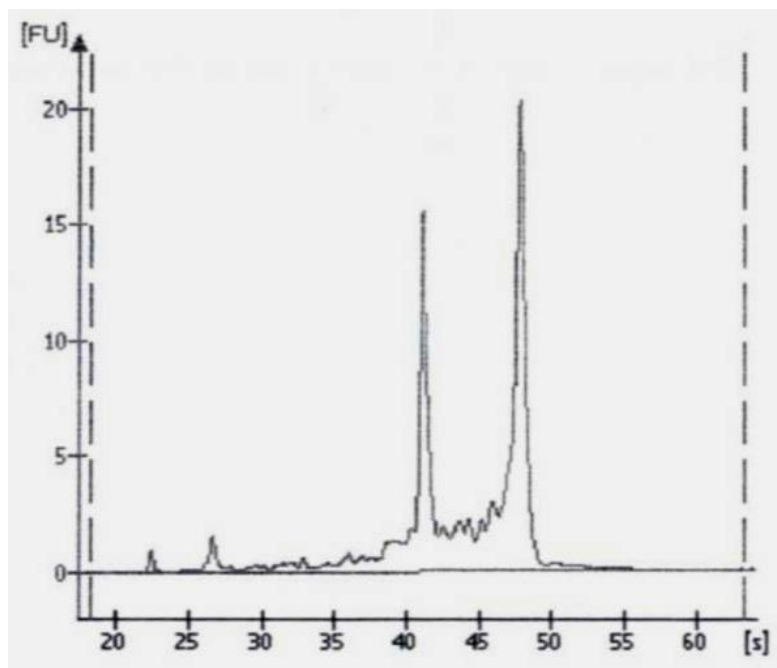
18 échantillons de sang total de chevaux sains ont été nécessaires pour affiner les conditions de purification des ARNs leucocytaires. La qualité des profils de migration électrophorétique de ces échantillons a été vérifiée en appliquant le mode de préparation situé en annexe 3 (figure II-2).

L'ensemble des échantillons a été travaillé en parallèle afin qu'ils subissent chacun les mêmes manipulations pendant les mêmes durées pour que leur qualité évolue globalement (même nombre de décongélation, même durée d'entreposage sur glace...).



*Figure II-2 : Profils de migration électrophorétique des échantillons d'ARNs totaux leucocytaires. Analyse sur Bioanalyzer™ Agilent™. Les huit échantillons analysés présentent un profil caractéristique d'une préparation d'ARNs de qualité permettant la visualisation nette des ARNs ribosomiques 18S et 28S.
(profils virtuels recomposés à partir de mesures densitométriques)*

La représentation des mesures densitométriques illustre l'obtention de profils caractéristiques d'échantillons d'ARNs de qualité. Ils sont, *a priori*, compatibles avec les applications que nous envisageons : marquage et hybridation sur puces pan-génomiques, PCR quantitative (figure II-3).



*Figure II-3 : Mesures densitométrique des échantillons d'ARNs totaux leucocytaires. Analyses sur Bioanalyzer™ Agilent™. L'échantillon présente un profil caractéristique d'une préparation d'ARNs de qualité permettant la visualisation successive des ARNs ribosomiques majoritaires 18S et 28S.
(profil mesuré lors du passage des ARNs dans la fenêtre d'intégration)*

Le dosage de ces ARNs a été réalisé grâce au spectromètre nanodrope de la plate forme BioPuces du Génomopôle-Toulouse. Celui-ci permet de conduire des dosages dans des échantillons d'un volume de 1 μL , ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte d'échantillons obtenus dans des conditions limitantes.

Les échantillons préparés à partir de nos prélèvements standardisés de sang de cheval (5mL de sang total prélevé sur héparinate de sodium) conduisent à des quantités d'ARNs leucocytaires de 10 à 25 μg (concentrations voisines des 0,3 à 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ces quantités sont parfaitement compatibles avec nos besoins ultérieurs (2 μg pour transcription inverse avant PCR quantitative, 250 ng pour marquage en vue d'hybridation) (figure II-4).

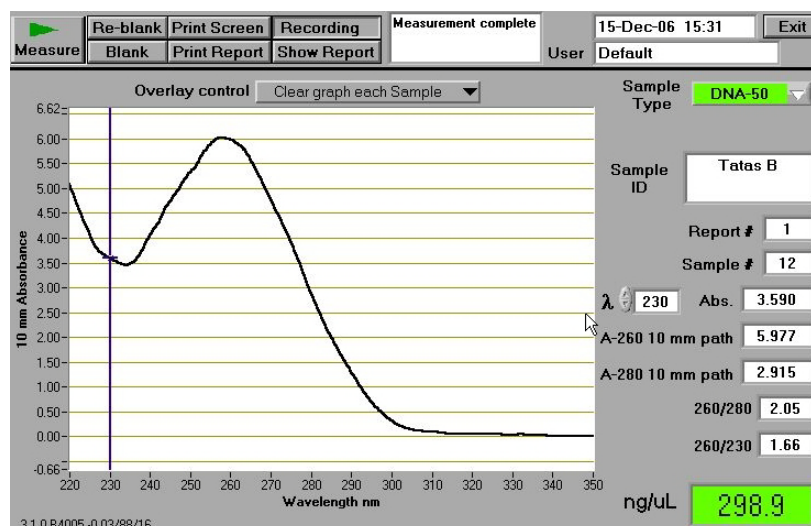


Figure II-4 : Dosage des ARNs totaux leucocytaires. Analyses sur NanoDrop®-ND-1000 (mesure de la concentration en ARNs dans un volume d'échantillons de 1 μ L). L'échantillon présente un profil caractéristique d'une préparation d'acides nucléiques. Le rapport DO260/DO280 nm indique un faible niveau de contamination de la préparation par des protéines résiduelles.

ii. Validation de l'analyse en PCR quantitative sur ARNs totaux leucocytaires équins

Les échantillons ont été validés pour des usages de PCR quantitative (=PCR en temps réel). En effet, la qualité des ARNs nécessaire est comparable à celle requise pour des études transcriptomiques.

Le gène β Act (β -actine), connu pour permettre de normaliser des études de niveaux d'expression de messagers multiples, d'être invariant au regard des conditions expérimentales et notamment insensible à l'exposition l'hormone de croissance, a été choisi pour l'amplification. Ce gène n'étant pas présent dans les banques de données génomiques du cheval, nous avons procédé à l'alignement des séquences génomiques de ce gène dans plusieurs espèces (homme, bovin, ovin, singe, souris, rat, ainsi qu'une séquence équine ADNc). Un segment de 84pb est hautement conservé entre les espèces. Il chevauche l'intron 3. L'équipe de l'INRA a dessiné des amorces à ses extrémités (logiciel AbiPrism™ Primer Express™, Applied Biosystems), dans les zones de plus haute conservation. L'amplification sur ARNs leucocytaires équins a d'emblée donné un résultat positif.

L'ensemble des échantillons d'ARNs leucocytaires qui avaient été préparés ont ensuite été analysés dans ces conditions. La figure II-5 illustre les résultats obtenus avec six échantillons préparés à partir d'animaux normaux prélevés à des jours différents afin d'inclure la variabilité interindividuelle et temporelle. On observe alors qu'au seuil retenu, les courbes d'amplification sont rassemblées dans un intervalle inférieur à la valeur d'un cycle.

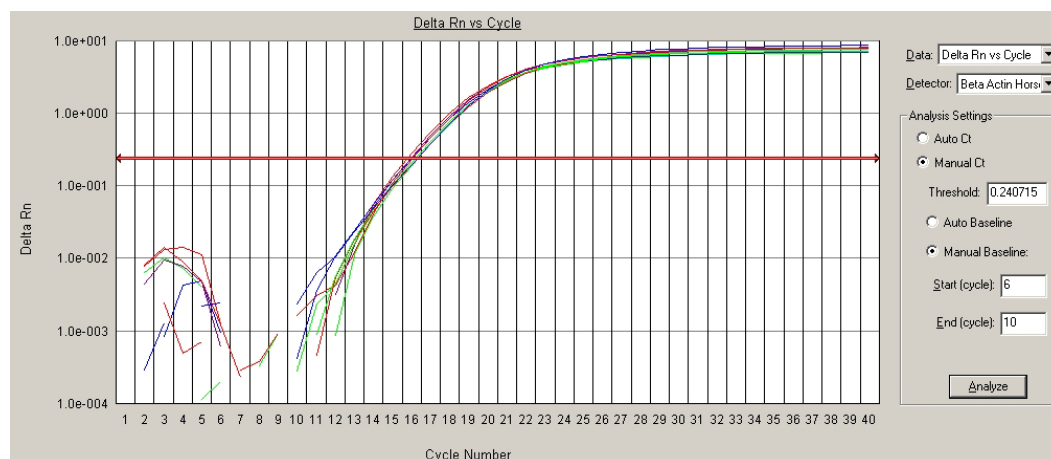


Figure II-5 : Courbe de PCR quantitative en temps réel réalisée avec des amorces dessinées pour le gène de la β -actine du cheval sur les ADNc de 6 animaux différents, en duplicats. On constate une très bonne reproductibilité inter-échantillons

h. Conduite de l'analyse transcriptomique des ARNs leucocytaires

i. Plan d'hybridation et stratégie employée

La stratégie a été mise au point par Pascal Martin de l'INRA.

L'objectif final de ce projet a été d'évaluer si l'on pouvait trouver de bons biomarqueurs d'exposition à la GH au sein de la population des ARNs de leucocytes sanguins du cheval. Etant donné les effectifs limités des groupes, l'impossibilité de recourir à des hybridations homologues sur puces cheval, et le fait que les puces à ADN ne sont utilisées que dans une étape préliminaire de criblage et donc ne constitueront pas l'outil final de détection de l'expression des gènes (qui sera la PCR quantitative ou RT-QPCR), il semble peu opportun de chercher à répondre directement à cette question par une stratégie qui consisterait à utiliser en première intention des méthodes de prédiction de classe sur les profils d'expression obtenus. Le principal risque proviendrait du fait que la validité de la méthode de prédiction serait sûrement dépendante de la puce utilisée.

Pour cela, nous avons donc cherché à répondre successivement à quatre questions.

- **Question n°1** : Quels sont les gènes différentiellement exprimés entre les chevaux traités à la GH et les chevaux contrôles à J13 (jour de la dernière administration d'hormone) et cela de façon significative ?
- **Question n°2** : Quels sont les gènes significativement modulés par la GH entre J0 et J13 (et qui ne sont pas modulés chez les individus contrôles au cours de la même période) ?
- **Question n°3** : Quels sont les gènes qui sont encore significativement et différentiellement exprimés entre les chevaux traités à la GH et les chevaux contrôles à J15 (48h après la dernière administration d'hormone) ?
- **Question n°4** : Quels sont les gènes qui sont encore significativement et différentiellement exprimés entre les chevaux traités à la GH et les chevaux contrôles à J17 (96h après la dernière administration d'hormone) ?

La première question permet de récupérer un maximum de gènes pour avoir un minimum de faux négatifs. Les autres questions constituent des filtres pour avoir les meilleurs candidats et surtout les plus observables.

ii. Choix des couples d'échantillons à hybrider

La technologie utilisée dans cette étude (AgilentTM) procède d'une hybridation compétitive d'échantillons considérés par paires (condition expérimentale vs condition de référence). Un échantillon correspond en fait à un transcriptome complet. Il va être marqué par un fluorochrome, la cyanine 3-CTP (Cy3), qui va permettre d'enregistrer les images d'hybridation à la puce dans la longueur d'onde verte. L'autre échantillon qui constitue la paire va être marqué par la cyanine 5-CTP (Cy5) de façon à enregistrer des images dans la longueur d'onde rouge. Les ADNc sont ensuite mélangés en quantités rigoureusement équivalentes et mis en contact avec la puce à ADN. Celle-ci correspond à une grille composée de 44 000 dépôts différents de fragments d'ADNs (oligonucléotides 60 mer, représentant au mieux le génome complet de l'animal). Les transcrits spécifiques de l'ADN concerné, marqués « en vert » (Cy3) et « en rouge » (Cy5) vont alors, pour chaque point de dépôt, rentrer en compétition pour la fixation au site. Il en résulte alors, pour chacun des 44 000 points de lecture et d'enregistrement de chaque puce, une couleur mesurée qui correspond à un mélange de vert et de rouge qui représentent les proportions relatives d'un transcrit entre les deux conditions « traité » et « contrôle ». Une signature comportant 44 000 variables mesurées est alors produite pour chaque paire d'échantillon analysée.

Il a été mis en œuvre un protocole d'hybridation qui permette de limiter au maximum la variabilité lors de ces étapes de criblage et facilite ainsi la détection des gènes candidats. Les animaux les plus similaires possibles selon les facteurs sexe et âge ont donc été hybridés l'un contre l'autre.

Question 1 :

Les échantillons à J13 uniquement sont utilisés (Hestia=CF12 comprise) ainsi que la notation suivante : première lettre = C (contrôles) ou T (traités), deuxième lettre = H (hongre) ou F (femelle) puis l'âge de l'animal. On obtient le plan d'hybridation suivant, nommé dye swap (<http://biopuce.insa-toulouse.fr/fr/infotec.php>) qui correspond à l'hybridation de chaque couple d'individus sur deux puces en inversant le sens des fluorophores (figure II-6)

Cy3	Cy5
CH7	TH8
TH8	CH7
CH11	TH12
TH12	CH11
CH13	TH15
TH15	CH13
CF4	TF4
TF4	CF4
CF10	TF10
TF10	CF10
CF12	TF6
TF6	CF12

Figure II-6 : Plan d'hybridation dye swap : on compare un individu contrôle avec un individu témoin en Cy3 puis Cy5

Question 2 :

On utilise les échantillons à J0 et J13 (Hestia=CF12 comprise) pour chaque animal ainsi que la notation décrite ci-dessus (plus J0 ou J13). On obtient le plan d'hybridation suivant, nommé dye switch et qui correspond à un marquage équilibré par les deux fluorophores entre les deux groupes à comparer (ici J13 comparé à J0) sans que chaque échantillon soit marqué avec les deux fluorophores (figure II-7).

Cy3	Cy5
CH7 J0	CH7 J13
CH11 J13	CH11 J0
CH13 J0	CH13 J13
CF4 J13	CF4 J0
CF13 J0	CF13 J13
CF12 J13	CF12 J0
TH8 J0	TH8 J13
TH12 J13	TH12 J0
TH15 J0	TH15 J13
TF4 J13	TF4 J0
TF6 J0	TF6 J13
TF10 J13	TF10 J0

Figure II-7 : Plan d'hybridation dye switch: on compare chaque cheval par rapport à lui-même à J0 et J13

Question 3 et Question 4 :

On utilise pour chaque animal les échantillons à J15 (Question 3) ou à J17 (Question 4) et la notation ci-dessus. On obtient le plan d'hybridation suivant, qui est identique pour J15 et J17 (figure II-8).

Cy3	Cy5
CH7	TH8
TH12	CH11
CH13	TH15
TF4	CF4
CF10	TF10
TF6	CH5

Figure II-8 : Plan d'hybridation correspondant aux questions 3 et 4

Au total, on utilise 9 puces 4x44K Agilent™ « Rat » pour la réalisation de ces protocoles ((12+12+6+6)/4).

iii. Déroulement des expériences

Elles ont été menées par Arnaud Polizzi et Alexandre Eveillard (UR66) qui ont utilisé les ressources du génopôle de Toulouse, GénoToul, et ont eu accès au four à hybridation des puces à ADN, au scanner pour acquisition des données et au logiciel d'analyse initiale d'image.

Les étapes ont été les suivantes :

- Marquage des échantillons par Cy3 et Cy5 via une amplification linéaire des ARN (RT puis transcription in vitro en présence de NTP marqués par l'un des deux fluorophores Cy3 et Cy5) (annexe 9)
- Hybridation sur puces à ADN de rat 4x44K (annexe 10)
- Lecture des puces sur scanner Axon 4100B (plateforme transcriptome GénoToul, résolution 5 μ m, figure II-9) puis analyse des images à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction



Figure II-9: Scanner Axon 4100B

iv. Analyse des données

Toutes les analyses statistiques ont été conduites sous le logiciel R (www.r-project.org) en utilisant divers « packages » de Bioconductor (www.bioconductor.org), en particulier les « packages » limma, multtest, geneplotter et marray.

Déroulement des analyses :

1. Importation des données sous R et affectation de poids (0 ou 1 = absence ou présence) à chaque spot en fonction d'une série de critères de qualité (ex : saturation des intensités des pixels, rapport signal/bruit, homogénéité des spots).
2. Contrôle de la qualité des données par divers outils : génération de MA-plots représentant $M = \log(\text{signal dans le rouge} / \text{signal dans le vert}) = \log(R/G)$ en fonction de $A = [\log(\text{signal dans le rouge}) + \log(\text{signal dans le vert})] / 2$, observation d'effets spatiaux sur les puces via la génération d'images reconstruites des bruits de fond dans le vert et dans le rouge ou bien directement des $\log(R/G)$, étude graphique et numérique des corrélations des puces deux à deux, etc.
3. Sélection de spots sur la base de leur présence sur un nombre suffisant de puces
4. Correction de bruit de fond et normalisation par la méthode loess (Smyth et Speed, 2003) accompagnés de nouveaux contrôles qualité.
5. Recherche de gènes différentiellement exprimés via une modélisation linéaire des $\log(R/G)$ avec le package limma (fonction `lmFit`, Smyth, 2004). Obtention de statistiques modérées à l'aide d'une approche Bayésienne empirique (fonction `eBayes`). Sélection des gènes dont la p-value est inférieure à 1%.

2- Résultats

a. Contrôles qualité

Des contrôles qualité, effectués sur chaque puce et sur chaque ensemble de puces répondant à une question donnée, ont donné des résultats tout à fait satisfaisant, démontrant ainsi que les données obtenues étaient de bonne qualité.

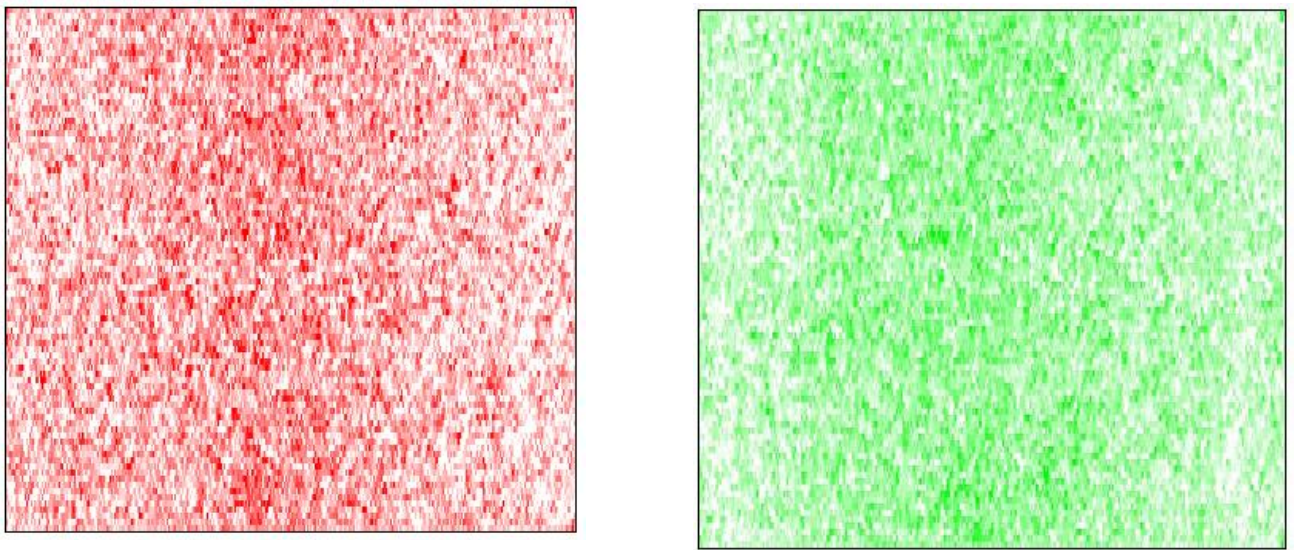


Figure II-10 : Images reconstruites des bruits de fond dans le rouge et dans le vert

Les bruits de fond sont relativement homogènes sur l'ensemble de la puce, avec une bande centrale légèrement plus intense (figure II-10). Cette observation, réalisée sur l'ensemble des 36 puces qui ont été hybridées, semble être une caractéristique liée au protocole et donc sans biais pour les données.

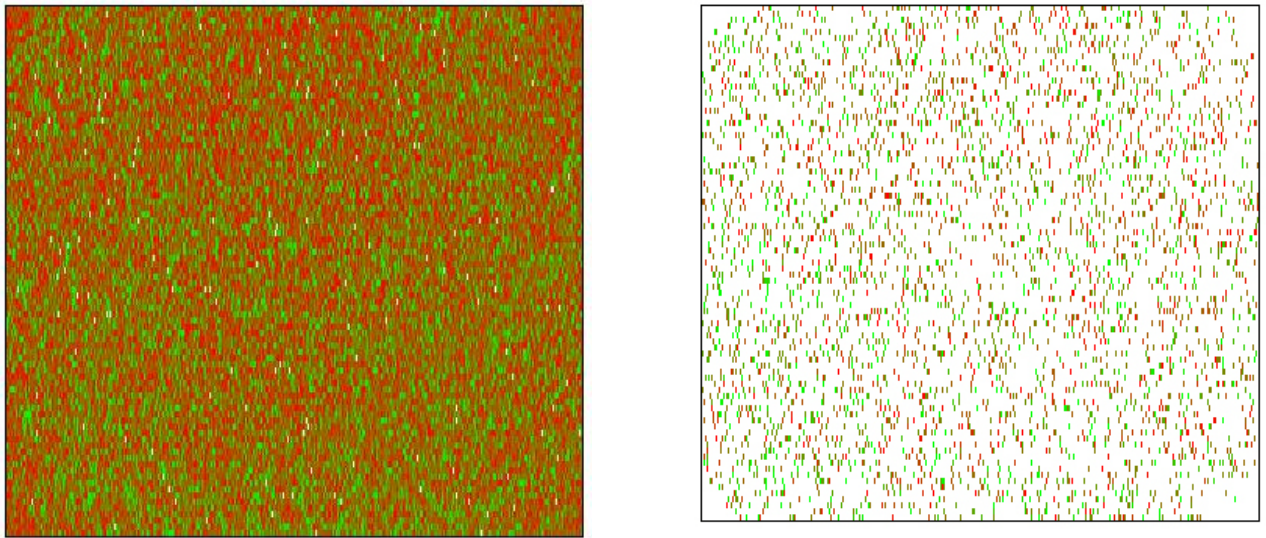


Figure II-11 : Images reconstruites des $\log(R/G)$ avant (à gauche) et après (à droite) sélection des spots

Aucun effet spatial net n'est observé (figure II-11). Même en l'absence de correction de bruit de fond et de normalisation (image de gauche), l'existence de la bande verticale de bruit de fond plus intense ne semble pas influencer de manière notable les $\log(R/G)$.

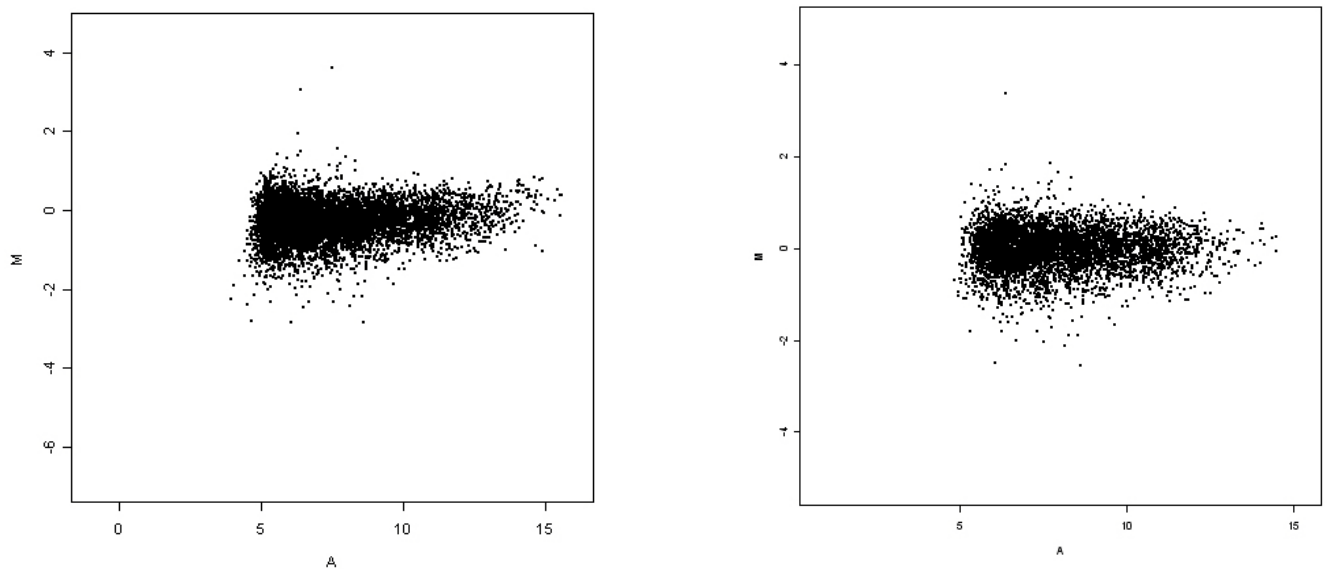


Figure II-12 : MA-plots avant (gauche) et après (droite) correction de bruit de fond et normalisation

Les données apparaissent relativement peu dispersées avant les étapes de correction de bruit de fond et de normalisation (figure II-12, image de gauche). On observe cependant un léger biais de marquage (M) dépendant de l'intensité (A). La dispersion des données n'est

quasiment pas affectée par les étapes de correction et de normalisation qui corrigent néanmoins le biais dépendant de l'intensité (image de droite).

b. Gènes différentiellement exprimés dans le contexte de l'étude

Pour chacune des questions 1 à 4, des listes de gènes différentiellement exprimés ($P < 0,01$) ont été obtenues. Elles sont présentées en annexe 11.

Résultats des filtres et de l'étape de sélection :

Question 1 :

Filtres et sélection : 5439 spots ont été analysés (spots déclarés présents sur au moins 4 des 6 dye-swaps).

Gènes différentiellement exprimés : 129 spots ont été sélectionnés ($p < 0,01$) chez les individus traités. Pour cette sélection, la méthode de Benjamini et Hochberg (1995) indique un FDR (False Discovery Rate) de 42%.

Question 2 :

Filtres et sélection : 5911 spots ont été analysés (spots déclarés présents sur au moins 4 puces chez les contrôles et 4 puces chez les traités).

Gènes différentiellement exprimés : 494 gènes ont été sélectionnés ($p < 0,01$) chez les individus traités. Pour cette sélection, la méthode de Benjamini et Hochberg (1995) indique un FDR (False Discovery Rate) de 12%. Dans cette liste, seuls 3 gènes sont détectés comme significatifs à 1% chez les contrôles (avec un FDR de 100%).

Questions 3 et 4 :

Filtres et sélection : 3 sélections de spots ont été réalisées :

- A J15 on retient 6967 gènes déclarés comme présents sur au moins 4 puces parmi les 6
- A J17 on retient 5601 gènes déclarés comme présents sur au moins 4 puces parmi les 6
- J15 et J17 : on retient 5446 gènes déclarés présents sur au moins 4 puces pour J15 et sur au moins 4 puces pour J17

La troisième sélection a été réalisée pour tenir compte du fait que dans les protocoles d'hybridation destinés à répondre aux questions 3 et 4, nous disposions de moins de puces que pour répondre aux autres questions. La combinaison des données à J15 et J17 et la considération d'un effet « post-traitement » sur l'expression des gènes nous a permis de retrouver un nombre de puces cohérents avec les plans d'hybridation réalisés pour répondre aux questions Q1 et Q2.

Gènes différentiellement exprimés : les 3 listes de gènes ont été étudiées :

- J15 : 128 gènes sélectionnés ($p < 0,01$, FDR=53%)
- J17 : 171 gènes sélectionnés ($p < 0,01$, FDR=32%)
- J15 et J17 : 417 gènes sélectionnés ($p < 0,01$, FDR=13%)

Ces sélections ont des intersections non nulles, comme le montre le diagramme de Venn (figure II-13).

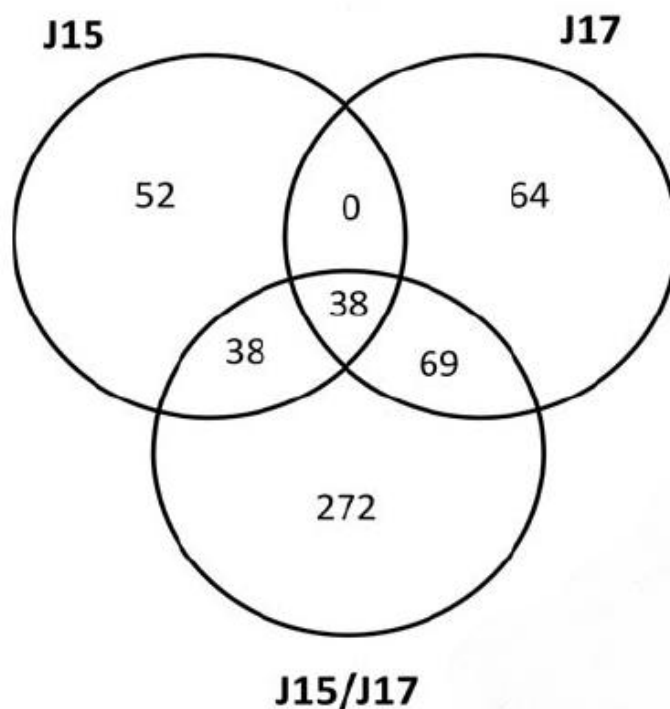


Figure II-13 : Intersections des sélections de gènes différentiellement exprimés entre les trois jeux de données J15 (Question 3), J17 (Question 4) et J15+J17 (Question 3 et Question 4) : 38 gènes sont communs aux 3 ensembles

De même, les listes de gènes détectés pour répondre aux questions 1, 3 et 4 ont des intersections non nulles ; la question 2 correspondant à un protocole particulier où chaque individu est hybridé contre lui-même à J0 et J13 (figure II-14).

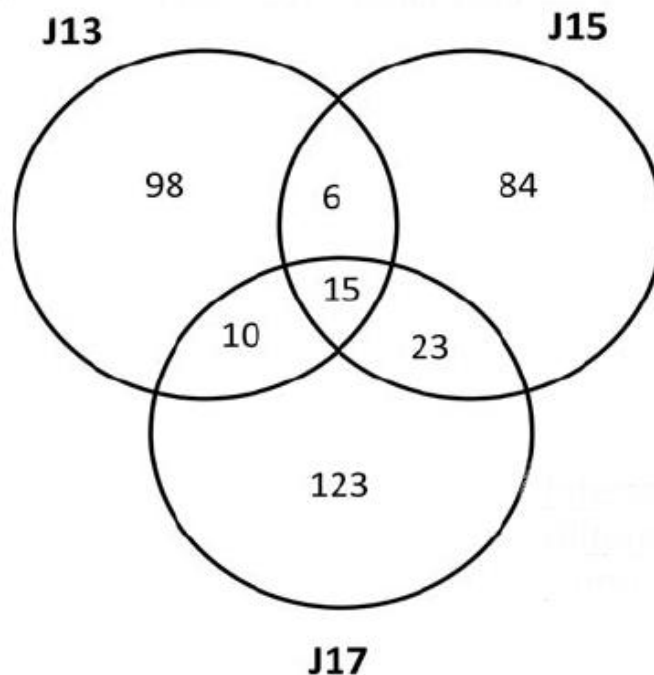


Figure II-14: Intersections des sélections de gènes différentiellement exprimés entre les trois jeux de données J13 (Question 1), J15 (Question 3) et J17 (Question 4) : 15 gènes sont communs aux 3 ensembles

c. Résultats obtenus

i. Filtres et sélection de gènes

Pour chaque expérience, il a été sélectionné un nombre relativement constant de spots, situé entre 5500 à 6000 spots. Ce nombre est en dessous de ce que l'on pourrait penser. En effet, lors d'expériences d'hybridation homologues (ARN de rat sur puces « Rat », de bovin sur puce « Bovin ») utilisant des filtres identiques sur des puces du même fournisseur, on obtient en général des sélections de l'ordre de 12 000 à 18 000 spots. Ces sélections de taille réduite sont très probablement liées à la réalisation d'hybridations hétérologues (ARN de cheval sur puce « Rat »). L'existence de différences de séquences et de gènes interespèces ne permet donc pas d'explorer la totalité du transcriptome sanguin. Ces éléments sont en faveur du développement d'une puce à ADN spécifique du cheval sur la base des données de séquençage disponibles (http://www.ensembl.org/Equus_caballus/index.html).

ii. Sélection de gènes différentiellement exprimés

La fixation d'un seuil $\alpha=0,01$ (seuil de p-values) nous a permis d'obtenir une certaine homogénéité dans le nombre de gènes qui sont déclarés comme significativement

différentiellement exprimés. En effet, nous avons obtenu des listes de 129 gènes, 128 gènes et 171 gènes à J13, J15 et J17 respectivement quand nous comparons les individus traités à la GH aux individus contrôles. Cependant, les FDR associées à ces listes sont plus variables, allant de 32 % à 53 % pour ces 3 mêmes listes.

La réalisation des histogrammes des p-values, notamment pour les 5911 gènes analysés par la question 2, permet de témoigner en faveur d'un effet du traitement.

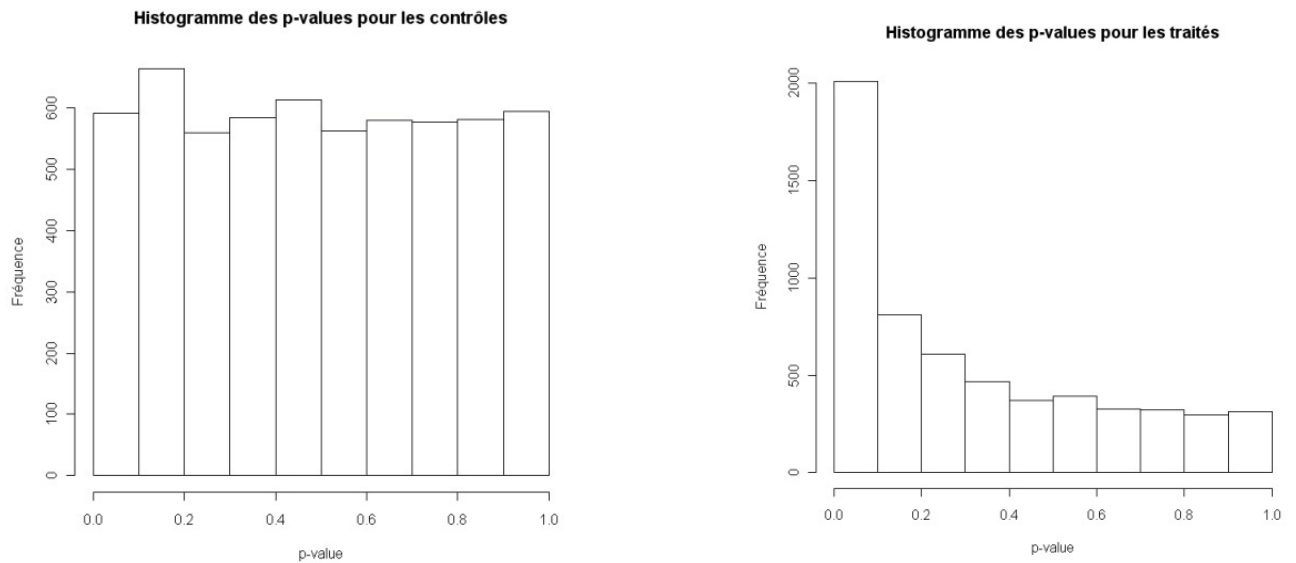


Figure II-15 : Histogramme des probabilités critiques (p-values) pour l'expérience de la question 2 chez les individus contrôles (gauche) et les individus traités à la GH (droite). Chez les contrôles, on a une distribution uniforme entre 0 et 1. Chez les traités, on a une surabondance de p-values faibles, ce qui signe un effet du traitement global sur l'expression des gènes.

L'histogramme pour les contrôles (figure II-15, à gauche) est quasiment plat et correspond à une loi de distribution uniforme sur $[0,1]$, identique à ce que l'on attend en l'absence totale d'effet du traitement. En revanche, l'histogramme pour les individus traités (à droite) met en évidence une surabondance des valeurs de p (p-values) faibles, signant un effet net du traitement sur un nombre important de gènes. La question Q2 compare chaque individu par rapport à lui-même, avant et après traitement, permettant de réduire fortement la variabilité interindividuelle pour se concentrer sur la variabilité de réponse au traitement. Elle permet donc d'obtenir la liste la plus conséquente de gènes différentiellement exprimés (494 spots significatifs) entre J0 (avant le début du traitement) et J13 (dernier jour de traitement). Cependant, les comparaisons directes entre groupes traités et non traités à différents

moments : J13 (Question 1), J15 (Question 2) et J17 (Question 3) restent indispensables car le plan expérimental Q2 ne suffit pas pour répondre à la question globale de recherche de candidats permettant de distinguer les individus traités des individus non traités. Les autres questions tiennent compte de la variabilité interindividuelle, liée en particulier au sexe, à l'âge, au statut sanitaire des animaux et à l'environnement en général et donc détectent moins de gènes différentiellement exprimés.

Les diagrammes de Venn réalisés ci-dessus ont permis de définir des listes de candidats intéressants pour la suite de cette étude. Nous avons défini un ensemble de 54 transcrits en nous basant dans un premier temps sur les réponses aux questions 1 et 2. La réalisation d'une « carte de chaleur » ou heatmap, représentant les données de $\log(J13/J0)$ a mis en évidence la séparation des individus contrôles par rapport aux individus traités grâce à cette liste de spots (figure II-16).

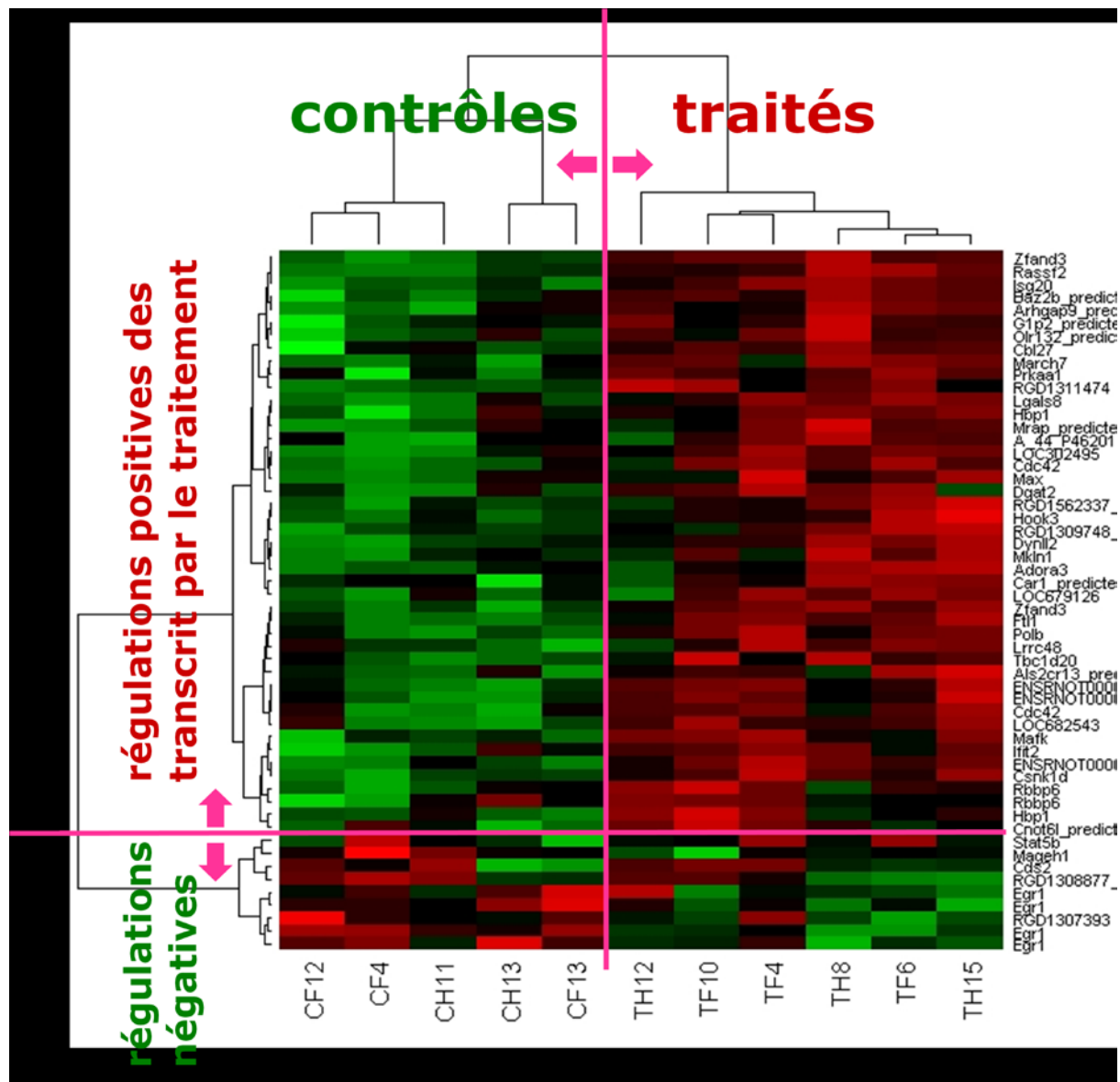


Figure II-16 : Heatmap, obtenue par une analyse statistique sans a priori, utilisant 54 transcrits sélectionnés et séparant finalement les individus contrôles des individus traités.

Cette heatmap représente les $\log(J13/J0)$ pour les individus contrôles et traités. Les couleurs de cette heatmap indiquent les valeurs des $\log(J13/J0)$. Le rouge signifie une valeur fortement positive, le vert une valeur fortement négative et le noir une valeur proche de zéro. Les arbres de classification sont obtenus par classification ascendante hiérarchique des individus ou des gènes sur la base de la distance 1-corrélation avec un critère d'agglomération de Ward.

Parmi ces 54 spots, 41 sont retrouvés dans la liste obtenue en combinant les données à J15 et J17 (Q3 et Q4). Cependant, seuls 6 spots parmi ces 54, correspondant à 6 gènes différents, sont retrouvés à la fois dans la liste à J15 (Q3) et dans la liste à J17 (Q4).

Voici la liste de ces 6 gènes :

- a. *Rattus norvegicus* signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA [NM_022380]
- b. *Rattus norvegicus* TBC1 domain family, member 20 (Tbc1d20), mRNA [NM_001004281]
- c. AY769435 mesoderm induction early response 1 N1 beta {*Mus musculus*} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (51%) [TC612555]
- d. *Rattus norvegicus* Ac1288 mRNA, complete cds [AY310154]
- e. *Rattus norvegicus* dynein light chain LC8-type 2 (Dylnl2), mRNA [NM_080697]
- f. *Rattus norvegicus* zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]

Il est intéressant de noter la présence du facteur de transcription Stat5b qui est une cible bien connue de la GH dans d'autres espèces.

d. Conclusions sur les résultats de transcriptomique

Des hybridations d'ARNs équins sur des puces « Rat », bien qu'hétérologues, s'avèrent tout à fait pertinentes pour identifier un certain nombre de différences relatives d'abondance de transcrits.

Nous avons établi que ces différences d'abondance de transcrits dans les échantillons surviennent, dans le leucocyte circulant équin, en réponse à l'exposition à l'hormone de croissance (18 µg/kg/j, 14 jours), permettant ainsi de valider notre hypothèse de travail. Il est donc raisonnable de conclure, par extrapolation, que l'hormone de croissance agit effectivement sur le globule blanc circulant de cheval en modifiant le niveau d'expression d'un panel de gènes cibles que nous avons identifié dans ce travail. L'étude de ce panel de gènes livre une réponse sous la forme d'une « signature moléculaire » qui permet indubitablement de discriminer les individus exposés à l'hormone de ceux qui ne l'ont pas été.

e. Utilisation de la PCR quantitative pour valider la pertinence des gènes candidats retenus et construire leur cinétique de réponse à l'hormone durant le protocole

Les gènes identifiés dans le cadre des criblages sur puce à ADN ont été validés par RT-PCR.

Pour cela, la sonde nucléotidique du génome du rat présente sur la puce a été alignée sur le génome du cheval afin d'identifier le transcrit correspondant à la sonde. Nous avons observé une bonne cohérence entre les annotations des spots de la puce « Rat » et les séquences équines obtenues via ces alignements. Nous avons ainsi pu dessiner des amorces nucléotidiques spécifiques du transcrit de cheval ciblé. Chaque couple d'amorce a alors été validé expérimentalement pour la quantification relative de l'expression génique. Il a donc été validé des amorces pour quatre gènes candidats : Stat5b, Dynll2 et Zfand3 qui semblent induits par la GH, Egr1 qui semble réprimé par la GH), plus un gène de contrôle : la β 2-microglobuline, validée préalablement.

Des PCR en temps réel sont réalisées afin de retracer, pour chaque individu, son profil d'expression pour chacun de ces gènes. Trois de ces quatre gènes candidats présentent des différentiels d'expression cohérents par rapport aux résultats des criblages à J19, soit 6 jours après la fin du traitement par la GH (figure II-17).

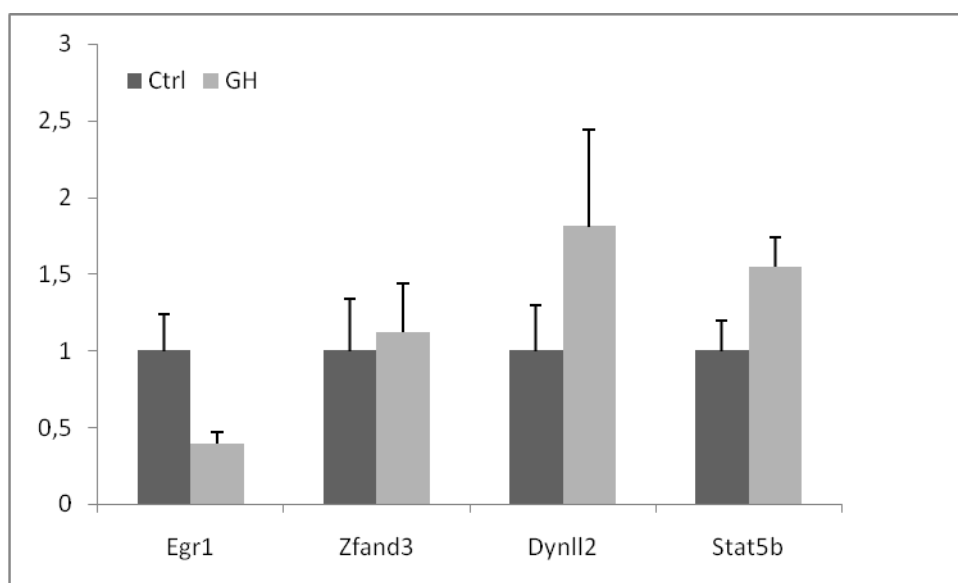


Figure II-17 : Expression relative de 4 gènes candidats à J19 : Egr1, Dynll2 et Stat5b sont les plus significatifs

3- Discussion

La détection de gènes différentiellement exprimés dans les leucocytes sanguins de chevaux exposés à la GH ouvre de nouvelles perspectives dans le cadre de la lutte antidopage. En effet, chez le cheval, la démonstration indirecte de l'exposition à la substance dopante suffit comme preuve de dopage, contrairement à ce qu'il se passe chez l'homme où il y a obligation de mettre en évidence la molécule dopante (Pineau, 2006).

Notre étude sur puce de « Rat » nous permet d'avoir des résultats significatifs, avec notamment trois gènes (Egr1, Dynll2 et Stat5b) intéressants pour la détection de l'administration d'hormone de croissance. Parmi ces gènes, deux sont liés à la réponse à la GH. Egr1 est une protéine nucléaire qui fonctionne comme un régulateur transcriptionnel et dont l'expression est stimulée par la GH (Hodge et al, 1998). Stat5b est un facteur de transcription qui est phosphorylé et activé par la GH (Moller et al, 2009).

Les données issues des criblages sur microarrays de Rat ont également été analysées grâce à des méthodes permettant d'identifier des gènes prédictifs de l'exposition à la reGH (forêts aléatoires, analyse discriminante). On retrouve plusieurs des gènes évoqués dans ce rapport dans les listes de gènes issues de ces analyses, notamment Egr1, Dynll2 et Stat5b. Huit gènes ont été sélectionnés à partir de ces différentes analyses et font actuellement l'objet d'analyses complémentaires en qPCR dans le but d'obtenir leur profil d'expression pour chaque cheval au cours de la cinétique. Cette liste de gènes autorise à court terme l'évaluation d'un test de dépistage indirect disponible sur le terrain à partir d'une simple prise de sang.

Cette technique présente plusieurs avantages. Elle correspond à la durée de réalisation de l'analyse par PCR en temps réel de l'échantillon (de l'ordre de quelques heures), ce qui en fait un test facilement réalisable en routine. La PCR est également la technique de mesure de l'expression des gènes qui a la plus grande sensibilité (Martin, 2007). Par ailleurs, la méthode ainsi que le protocole de mise au point de cette liste de transcrits permettent de s'affranchir de variables telles que le sexe, l'âge et la race du cheval, autorisant donc l'utilisation de ce test dans les différentes disciplines équestres et hippiques. La durée de détection post traitement est intéressante par rapport aux anciennes méthodes. Notre étude s'arrête à J19, mais la poursuite des expériences menée par l'INRA donnera des indications quand à la capacité de ces gènes à prédire une exposition à la reGH au-delà de J19.

Cependant, elle rend nécessaire la réalisation d'une prise de sang lors du contrôle antidopage. En règle générale, le vétérinaire en charge des prélèvements antidopage effectue un prélèvement d'urine, et c'est seulement lorsque le cheval ne veut pas uriner qu'il prélève

du sang. Il faudrait donc effectuer une prise de sang systématiquement (Annexe Code des Courses)

Enfin, la société Agilent a mis sur le marché en 2009 une puce « Cheval » (équine) en se basant sur la séquence du génome disponible. L'utilisation de cette puce pourrait sans doute permettre de révéler d'autres gènes, indétectables avec la puce « Rat », qui pourraient être de bons marqueurs de l'exposition à la GH.

CONCLUSION

Le recours à une analyse de l'expression de gènes biomarqueurs d'exposition à des produits dopants constitue un enjeu stratégique majeur notamment sur le plan sportif. Elle est déjà utilisée chez l'homme pour offrir une véritable vue d'ensemble de l'état physiologique de l'individu concernant la prise illicite de stimulants tels que ceux de la famille de l'EPO.

La découverte de ces gènes d'intérêt ouvre de nouvelles perspectives d'étude.

En effet, la modification d'expression de ces gènes va entraîner des changements dans les quantités de protéines produites par ces gènes. On aura donc des modifications dans les substrats et métabolites liés à l'action de ces protéines. L'étude du suivi de ces molécules dans le sang permettrait de représenter l'exposition du cheval à l'hormone de croissance. Pour cela, nos échantillons de plasma collectés au cours de notre étude et entreposés dans des conditions optimales (laboratoire de Verrières Le Buisson/ UMR181 Toulouse) constituent une ressource importante pour démontrer d'éventuelles corrélations entre prise d'hormone de croissance et dosages spécifiques éventuels.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que
Mlle Victoria, Sidonie, Danielle MERCADER
a été admis(e) sur concours en : 2005
a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 9 juillet 2009
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Pierre-Louis TOUTAIN, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,
autorise la soutenance de la thèse de :
Mlle Victoria, Sidonie, Danielle MERCADER

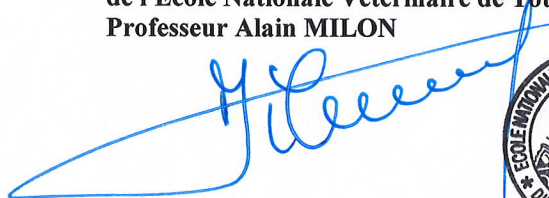
intitulée :

« Détection de l'administration d'hormone de croissance recombinante équine chez le cheval : Approche transcriptomique sur les leucocytes sanguins dans le cadre de la lutte antidopage. »

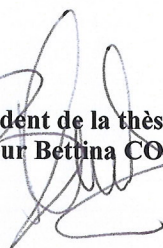
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Pierre-Louis TOUTAIN**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Bettina COUDERC**



**Vu le : 24 MARS 2010
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**



ANNEXES :

Journal officiel de la République Française Jeunesse et Sports

Arrêté du 21 novembre 1996 relatif aux substances et aux procédés mentionnés à l'article 12er, paragraphe II, de la loi n° 89-432 du 28 juin 1989 relative à la prévention et à la répression de l'usage des produits dopants à l'occasion des compétitions et manifestations sportives.

Le ministre du travail et des affaires sociales, le ministre de l'agriculture, de la pêche et de l'alimentation et le ministre délégué à la jeunesse et aux sports,

Vu la loi n° 89-432 du 28 juin 1989 relative à la prévention et à la répression de l'usage des produits dopants à l'occasion des compétitions et manifestations sportives, et notamment son article 1er, paragraphe II, visant les animaux ;

Vu l'avis de la commission restreinte de la Commission nationale de lutte contre le dopage en date du 20 mars 1996,

Arrêtent :

Art 1^{er}- Les substances, leur métabolites, quelles qu'en soient les formes stéréoisomère, visés à l'article 1^{er}, paragraphe II, de la loi du 28 juin 1989 susvisé, qu'ils soient ou non inclus dans un médicament ou toute préparation, sont regroupés par classes pharmacologiques en annexe au présent arrêté.

Art 2- Sont des procédés de nature à modifier les capacités des animaux participant à des compétitions et manifestations sportives :

Le dopage sanguin, défini comme l'administration de sang ou de produits susceptibles d'augmenter ou de stimuler la production de globules rouges ;

La névrectomie, définie comme la section des nerfs des membres des animaux ;

L'usage d'appareillages infligeant des stimuli électriques ou thermiques aux animaux ;

L'usage des procédés dit « de barrage » ;

Art 3- L'arrêté du 12 juillet 1994 relatif au même objet est abrogé.

Art 4- Le présent arrêté sera publié au Journal Officiel de la République Française.

Fait à Paris, le 21 novembre 1996

ANNEXE

-Substances agissant sur les téguments telles que : agents rubéfiants -Substances agissant sur le système immunitaire autres que celles qui sont présentes dans les vaccins et sérums agréés telles que : Immunodépresseurs ; Immunostimulants -Substances agissant sur la coagulation sanguine telles que : Anticoagulants ; Hémosiaticales généraux et coagulants. -Sécrétions endocriniennes et leurs équivalents synthétiques, substances agissant sur l'appareil reproducteur telles que : Androgènes ; Catécholamines ; Estrogènes ; Glucocorticoïdes ; Hormones hypophysaires ; Hormones peptidiques ; Hormones thyroïdiennes ; Minéralocorticoïdes ; Progestagènes (1) ; Protaglandines. -Substances agissant sur l'hématopoïèse. -Stimulants généraux de l'organisme. -Substances cytotoxiques. -Substances agissant sur le système cardiovasculaire telles que : Alpha bloquants ; Analeptiques circulatoires ; Antiangoreux ; Antirythmiques ; Antiathéromateux ; Antihypertenseurs ; Bêtabloquants ; Cardiotoniques ; Vasoconstricteurs ; Vasodilatateurs .	-Substances agissant sur le système respiratoires telles que : Analeptiques respiratoires ; Antitussifs ; Broncho-dilatateurs ; Expectorants ; Fluidifiants ; Mucolytiques ; Vasoconstricteurs O.R.L . -Substances agissant sur le système digestif telles que : Antidiarrhéiques ; Anti-émétiques ; Antisécrétoires gastriques ; Antispasmodiques ; Antisécrétoires anticholinergiques ; Antispasmodiques musculotropes ; Cholérétiques ; Emétiques ; Hépatoprotecteurs ; Purgatifs ; Stimulants sécrétoires. -Substances agissant sur le système musculo-squelettique telles que : Anabolisants ; Anti-inflammatoires non stéroïdiens ; Myorelaxants ; Sels d' or . -Substances agissant sur le système nerveux telles que : Analgésiques centraux ; Analgésiques périphériques ; Anesthésiques généraux ; Anesthésiques locaux ; Anorexigènes ; Anticholinergiques ; Antidépresseurs ; Antiépileptiques ; Antihistaminiques ; Antimigraineux ; Antiparkinsoniens ; Antipyréptiques ; Antisérotonine ; Anxiolytiques ;
---	--

Barbituriques ; Béta-agonistes ; Curarisants ; Hypnotiques non barbituriques ; Neuroleptiques ; Parasympatolytiques ; Parasympatomimétiques ; Psychodysléptiques ; Psychostimulants ; Sympatholytiques ; Sympatomimétriques ; Thymorégulateurs. -Substances agissant sur le système urinaire telles que : Antispasmodiques ; Diurétiques ; Inhibiteurs de la sécrétion urinaire ; Modificateurs de PH. -Substances agissant sur les organes des sens telles que : Antivertigineux ; Mydriatiques .	-Substances agissant sur le métabolisme telles que : Biguanides ; Sulfamides hypoglycémiantes . -Substances à effet tapon. -Substances dont l'usage est interdit pour une concentration supérieure à un seuil défini : Acide salicylique : 750 ug/ml d'urine ou 6,5 ug/ml de plasma ; Arsenic : 0,3 ug/ml d'urine ; Cortisol : 1 ug/ml d'urine ; Diméthylsulfoxyde : 15 ug/ml d'urine ou 1 ug/ml de plasma ; Dioxyde de carbone libre : 37 mmol/l de plasma ; Nandrolone : rapport des formes libres et conjuguées du 5 -oestrone- 3.17- diol dans l'urine égal ou inférieur à 1 ; Théobromine : 2 ug/ml d'urine.
--	---

(1) Sauf pour les chiennes, en vue de supprimer ou reporter l'apparition des chaleurs, sur prescription vétérinaire.

ART. 198

PRINCIPE GÉNÉRAL

I. Aucun cheval, dès lors qu'il a été déclaré à l'entraînement en France, même s'il en est sorti provisoirement, aucun cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, et aucun cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France, ne doit faire l'objet de l'administration :

- d'un stéroïde anabolisant,
- **d'un facteur de croissance,**
- d'une substance agissant sur l'érythropoïèse,
- d'un transporteur d'oxygène synthétique,
- ou d'une substance ayant des propriétés analogues aux substances ci-dessus,

Ce cheval ne doit pas non plus receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréctions, ou dans toute partie de son corps, un métabolite ou un isomère de l'une des substances ci-dessus, ou l'un des métabolites de cet isomère. Il ne doit pas non plus faire l'objet d'une manipulation sanguine. Ce cheval ne doit en outre pas receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréctions, une autre substance prohibée dont la présence ne peut être justifiée par l'administration de soins prescrits par une ordonnance.

Les personnes titulaires d'une autorisation d'entraîner ont l'obligation de respecter les dispositions de l'annexe 15 du présent code, relative au code de pratique des traitements administrés aux chevaux à l'entraînement.

II. Aucun cheval déclaré partant dans une course ne doit, à partir de la déclaration de partant, même s'il ne prend pas part à la course, jusqu'au moment où il est prélevé, faire l'objet de l'administration d'une substance prohibée ou d'une manipulation sanguine ni receler dans ses tissus, fluides corporels ou excréctions, une substance prohibée telle que définie au paragraphe III ci-après, ou l'un de ses métabolites, ou un isomère de cette substance ou de l'un de ses métabolites. Si après avoir été déclaré partant dans une course, un cheval a besoin de soins nécessitant l'administration d'une substance prohibée, l'entraîneur doit déclarer le retrait du cheval de la course et fournir un certificat vétérinaire.

III. Une substance prohibée est une substance appartenant à l'une des catégories de substances figurant sur la liste publiée en annexe 5 du présent Code.

Sauf justification prévue au second alinéa du paragraphe I du présent article, l'analyse des prélèvements biologiques effectués sur :

- un cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement.
- un cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France,
- un cheval déclaré partant même s'il ne prend pas part à la course, ne doit pas faire apparaître la présence d'une substance prohibée ou d'un métabolite d'une telle substance, d'un isomère de cette substance ou d'un de ses métabolites.

Les exceptions à cette interdiction qui ne peuvent être appliquées qu'aux substances endogènes chez le cheval ou aux substances provenant de la nourriture normale du cheval, sont énoncées ci-après :

- a) S'il s'agit d'une des substances endogènes chez le cheval pour lesquelles un seuil a été fixé, le prélèvement ne peut être déclaré positif que si la concentration de la substance dépasse le seuil physiologique normal défini internationalement par les analystes et vétérinaires officiels, adopté par les Commissaires de France Galop et publié au Bulletin Officiel des courses de galop. Quand l'analyse d'une substance endogène donne un résultat positif, les Commissaires de France Galop peuvent décider de faire procéder à tous examens et analyses complémentaires. Le propriétaire ou l'entraîneur peut demander que le cheval soit soumis, à ses frais, à tous examens et analyses complémentaires dans les conditions fixées par les Commissaires de France Galop afin de vérifier si la quantité de substance incriminée est produite naturellement ou non.
- b) S'il s'agit d'une substance provenant de la nourriture normale du cheval, le prélèvement ne peut être déclaré positif que si la concentration de la substance dépasse le seuil internationalement défini par les analystes et vétérinaires officiels et adopté par les Commissaires de France Galop. De tels seuils peuvent être fixés pour des substances provenant d'aliments normaux, c'est-à-dire de plantes traditionnellement broutées ou récoltées.
- c) Des seuils peuvent être aussi établis pour des substances trouvées en très faible quantité dans les aliments semi-manufacturés et qui proviennent de contamination en cours de fabrication ou de transport ou apportées par des facteurs d'appétence (voir annexe 5 du présent Code).

IV. D'autre part, la mise en évidence par l'analyse d'un indicateur scientifique prouvant qu'il y a eu administration d'une substance prohibée ou exposition à une substance prohibée est équivalente à la mise en évidence de ladite substance prohibée.

V. L'entraîneur est dans l'obligation de protéger le cheval dont il a la garde et de le garantir comme il convient contre toute infraction au principe général édicté au présent Code et son personnel doit se conformer à cette obligation. Il est notamment responsable de la nourriture, des conditions de vie et d'hébergement, de la protection et de la sécurité des chevaux dont il a la garde. Il lui appartient, en conséquence, avant d'entraîner ou de faire courir un cheval qui vient de rentrer dans son effectif à l'entraînement, de s'assurer par tous contrôles et analyses biologiques qu'il juge nécessaires que ce cheval ne recèle pas une substance prohibée dans ses tissus, fluides corporels, excréments ou tout autre partie de son corps.

VI. L'entraîneur doit se tenir précisément informé de tout traitement ou produit administré à ses chevaux et des conséquences des thérapeutiques qui leurs sont appliquées. Pour chaque traitement nécessitant l'utilisation d'un ou plusieurs produits entrant dans l'une des catégories de substances prohibées, l'entraîneur doit être en possession d'une ordonnance qu'il est dans l'obligation de pouvoir présenter au moment du contrôle effectué à la demande des Commissaires de France Galop. L'ordonnance doit préciser le nom du cheval ou le numéro "Sire" si celui-ci n'est pas encore nommé, le nom (ou la dénomination) du médicament, la posologie et la durée du traitement ainsi que les précautions à prendre avant de faire recourir le cheval. Il est tenu de numéroter chronologiquement chaque ordonnance au fur et à mesure des traitements prescrits aux chevaux dont il a la garde et de conserver toutes les ordonnances dans un classeur pendant au moins douze mois. L'entraîneur doit tenir ce classeur à la disposition des Commissaires de France Galop ou de toute personne mandatée par ces derniers. Lorsqu'une enquête est ouverte sur la présence d'une substance prohibée dans le prélèvement effectué sur :

- un cheval ayant été déclaré à l'entraînement en France, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement.
 - un cheval entraîné à l'étranger qui a été engagé dans une course régie par le présent Code, même s'il est sorti provisoirement de l'entraînement, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France,
 - un cheval déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course, l'entraîneur doit fournir ce classeur aux Commissaires de France Galop et à toute personne mandatée par ces derniers.
- Si l'enquête concerne un cheval sorti provisoirement de l'entraînement, la personne à qui a été confié le cheval doit fournir, au moment du contrôle, au vétérinaire mandaté par les

Commissaires de France Galop, l'ordonnance justifiant la présence de ladite substance prohibée.

VII. En sa qualité de gardien du cheval l'entraîneur est toujours tenu pour responsable lorsque l'analyse du prélèvement effectué sur :

- l'un des chevaux qu'il a déclaré dans son effectif à l'entraînement en France,
- l'un des chevaux déclaré dans son effectif à l'entraînement à l'étranger, qui est engagé dans une course régie par le présent Code, ou un cheval qui est provisoirement stationné ou entraîné en France.
- l'un des chevaux ayant été déclaré partant, même s'il ne prend pas part à la course. fait apparaître la présence d'une substance prohibée.

Si la présence d'une substance prohibée dans le prélèvement biologique du cheval, résulte d'une administration faite pendant la sortie provisoire du cheval de l'entraînement, la responsabilité incombera, selon les résultats de l'enquête, à la personne ayant été chargée de la surveillance du cheval pendant cette sortie provisoire et/ou à toute personne, soumise au Code, jugée fautive de l'infraction.



ENERGY

GRANULÉS



DP Nutrition a conçu sa gamme d'aliments pour répondre de manière spécifique aux exigences nutritionnelles de votre cheval quel que soit son activité, son environnement ou son stade physiologique. Chaque aliment a été formulé pour que ses besoins en énergie, protéines, fibres, matières grasses, minéraux et vitamines soient couverts de façon équilibrée.

CARACTÉRISTIQUES

La formule du DP Energy a été spécialement conçue pour couvrir les besoins du cheval ou du poney de sport sans apport supplémentaire de foin. Son C.A.B. élevé limite la fatigue musculaire et facilite la récupération. Un apport quotidien de cet aliment assurera par sa diversité en sources celluloseuses, et protéiques formulées sur la lysine, une bonne hygiène digestive et le maintien des masses musculaires; ses teneurs en vitamines, oligo-éléments et minéraux sont les garants de la vitalité, du bon fonctionnement du métabolisme et de la consolidation du squelette de votre cheval ou de votre poney de sport.

CONSTITUANT ANALYTIQUE (% DE KG MB)		ADDITIFS AU KG		OLIGO-ÉLÉMENTS		VALEURS NUTRITIONNELLES
Protéine brute	12,5 %	vit A	8000 u.i	manganèse	40 mg	Ufc : 0,75
Matière grasse brute	3,5 %	vit D3	1200 u.i	cuivre	12 mg	Madc : 105
Cendre brute	7,5 %	vit E	80 u.i	fer	72 mg	
Humidité	12 %	vit B1	4 mg	zinc	60 mg	
Cellulose brute	18 %	vit B2	3 mg	iode	0,3 mg	
Calcium	1,1 g	vit B5	8 mg	sélénium	0,24 mg	
Phosphore	5 g	vit B6	3 mg	cobalt	1,0 mg	
Lysine	0,5 %	vit PP	16 mg			
Méthionine +Cystine	0,4 %	Ac.Folique	0,32 mg			
		Biotine	0,04 mg			
		vit K3	2 mg			
		vit B12	0,05 mg			
		Choline	160 mg			

MODE D'EMPLOI*

Rationnement journalier (en 2 ou mieux 3 repas)

TRAVAIL	PONEYS (EN KG)	CHEVAUX (EN KG)		
	250	400	500	600
LEGER	3,8	5,1	5,6	6,2
NORMAL	4,5	6,3	6,9	7,6
INTENSIF	4,8	7,5	8,3	9,1

*Mettre à disposition de la paille propre pour assurer une autorégulation en fibre.

Quantités moyennes préconisées, à moduler en fonction de la qualité et de la quantité des fourrages disponibles.
Eau pure à volonté.



DP NUTRITION - www.cheval.dpnutrition.fr
7, rue Maréchal Gallieni 91360 Villemoisson sur Orge

"sans fourrage"

Annexe 4 : Fiche individuelle de suivi zootechnique

Experiment			Drug	eGH			
Horse : Dracon							
Sex :Gelding							
Age :xxx							
Poids(kg) :							
Rest/activity status :activity							
Nominal Meals per day :3							
Evenments	code	Dates	Normal meal Yes/No	Activity Yes/No	Good Health Yes/No	observation	signature
control	J-2						
control	J-1						
control	J0						
Dosing	J0						
Dosing	J1						
Dosing	J2						
Dosing	J3						
Dosing	J4						
Dosing	J5						
Dosing	J6						
Dosing	J7						
Dosing	J8						
Dosing	J9						
Dosing	J10						
Dosing	J11						
Dosing	J12						
Dosing	J13						
Post dosing	J14						
Post dosing	J15						
Post dosing	J16						
Post dosing	J19						
Post dosing	J23						
Post dosing	J30						
Post dosing	J40						
Post dosing	J50						
Post dosing	J60						
Post dosing	J70						
Post dosing	J80						

Annexe 5 : Fiche individuelle d'administration et de tolérance

Experiment							
Drug	eGH		Horse		Dracon		
Trademark			Sex		Gelding		
formulatio	solution		Age				
Route	SQ		BW (kg)				
			Rest/activity		Activity		
Evenments	code	Dates	Dose (µg/kg)	Volume (mL)	Skinfold (mm)	observation	signature
control	J-2		0				
control	J-1		0				
Dosing	J0		18				
Dosing	J1		18				
Dosing	J2		18				
Dosing	J3		18				
Dosing	J4		18				
Dosing	J5		18				
Dosing	J6		18				
Dosing	J7		25				
Dosing	J8		25				
Dosing	J9		25				
Dosing	J10		25				
Dosing	J11		25				
Dosing	J12		25				
Dosing	J13		25				

Annexe 6 : Fiche individuelle de prélèvement sanguin

Horse			<i>Dracon</i>		
Sex			<i>Gelding</i>		
Age					
BW (kg)					
Rest/activity			<i>Activity</i>		
Drug			<i>eGH</i>		
Route			<i>SQ</i>		
events	Sampling date	Actual Sampling times (min or h)	Actual Post injection time (h)	plasma sample identification	Observations
Control -48h			-48		
Control -24h			-24		
J0 control			0		First administration
J0 à +10min		+			
J0 à +30 min		+			
J0 à +60 min		+			
J0 à +2h		+			
J0 à +4h		+			
J0 à +6h		+			
J1 i.e. +24 h		+			
J3					
J5					
J7					
J9					
J11					
J13 à 0min					last administration
J13 à +10 min		+			
J13 à +30 min		+			
J13 à +60 min		+			
J13 à +2h		+			
J13 à + 4h		+			
J13 à +6h		+			
J13 à +8h		+			
J14 à 0h					
J14 à +8h					
J15 à 0h					
J15à +8h					
J16					
J19					
J23					
J30					
J40					
J50					
J60					
J70					
J80					

Annexe 7 : Fiche individuelle de prélèvement urinaire

Horse			<i>Dracon</i>		
Sex			<i>Gelding</i>		
Age					
BW (kg)					
Rest/activity			<i>Activity</i>		
Drug			<i>eGH</i>		
Route			<i>SQ</i>		
events	Sampling date	Sampling times (h)	Post injection time (h)	plasma sample identification	Observations
control					
control					pH
control					
J0		0	0	No sample	First administration No sample
J1			24		
J3			72		
J5					
J7					
J9					
J11					
J13					last administration pH
J14					
J15					
J16					
J19					
J23					
J30					
J40					
J50					
J60					
J70					
J80					

Annexe 8 : Protocole de préparation des ARN

Avec l'aimable autorisation de l'UR66-INRA

1. Sommaire

Page de garde Page 1

1. Sommaire Page 2

2. Objet Page 2

3. Domaine d'application Page 2

4. Diffusion Page 2

5. Nominations Page 2

6. Définitions Page 2

7. Matériels et consommables Page 3

8. Prévention et sécurité Page 3

9. Documents attachés Page 4

10. Réalisation Page 4

2. Objet

Extraire, à partir d'un culot de globules blanc circulants du sang de cheval, de l'ARN d'une pureté optimale pour procéder à des PCR temps réel et/ou à des hybridations sur microarray.

3. Domaine d'application

Application de ce protocole dans le cadre de l'étude HarasGH.

Applicable uniquement sur des échantillons de sang frais.

4. Diffusion

Ce protocole est destiné à tout personnel INRA ou des Laboratoires des Courses Hippiques désirant extraire de l'ARN à partir d'un sang frais de cheval.

5. Nominations

Sans objet

6. Définition

ARN ou RNA = acide(s) ribonucléique(s)

Vortexer = agiter avec un Vortex

EDTA = Ethylène Diamine Tris Acétate

ml = millilitre

min = minute

ACK = Ammonium - Chlorure - Potassium

μl = microlitre

mm = millimètre

PCR = Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

RT-PCR = transcription inverse par réaction de polymérisation en chaîne

7. Matériels et consommables

Matériel :

Centrifugeuse SIGMA 4K15	(AQM-INRA-31066-81)
Centrifugeuse EPPENDORF 5415R	(AQM-INRA-31066-82)
VORTEX Genie 2	
Distributeur d'eau ultra pure MILLIPORE Milli-Q A10	(AQM-INRA-31066-276)
Autoclave	(AQM-INRA-31066-217)
Spectrophotomètre NANODROP ND-1000	(Génopôle de Ranguel)
Pompe à vide	
Pipetman GILSON P200-1000μl et P20-200μl	
Pipette EPPENDORF Research 0.5-10μl	
Machine à glace BREMA Ice-Flaker	(AQM-INRA-31066-223)

Consommables :

Pointes à filtre 200-1000μl cristal TIP ONE	(réf : S1111-2720, STARLAB)
Pointes à filtre 20-200μl incolores TIP ONE	(réf : S1111-1700, STARLAB)
Pointes à filtre 0.5-10μl incolores TIP ONE	(réf : S1111-3700, STARLAB)
Kit INVITROGEN TRIzol plus RNA purification system	(réf : 12183-555, INVITROGEN)
Chlorure d'Ammonium NH ₄ Cl	(réf : A0171-500G, SIGMA)

Acide éthylène-diamine-tétraacétique -EDTA-	(réf : 20 294.294, PROLABO)
Hydrogénocarbonate de potassium KHCO ₃	(réf : P-7682, SIGMA)
Chloroforme CHCl ₃	(réf : 438613, CARLO ERBA)
Pipettes stériles « Stripettes » 10ml	(réf : 004101, ATGC)
Pipettes stériles « Stripettes » 25ml	(réf : 004251, ATGC)
Tubes VACUTAINER 5ml pour prélèvement sanguin sur héparinate de Sodium, à bouchon plastique HEMOGUARD vert	(réf : 367674, SUBRA)
Aiguilles VACUTAINER jaunes 20G	(réf : 360215, SUBRA)
Tube Holder VACUTAINER	(réf : 364815, SUBRA)
Aiguilles 23G TERUMO stériles	(réf : NN-2325R, VWR)
Seringues 2ml sans aiguille stérile TERUMO	(réf : 613-5400, VWR)
Microtubes 1.5 ml clear, boil-proof AXYGEN	(réf : MCT150C, ATGC)
Tubes 50ml, 114x28mm, Polypropylène, stériles	(réf : 62.547.254, SARSTEDT)
Ethanol absolu	(réf : 414607, CARLO ERBA)

8. Prévention et sécurité

Le Trizol contient : - de l'**isothiocyanate de guanidine** : **Nocif** : [Xn] – R : [20/21/22-32-52/53] – S : [36/37-61]

- du **phénol** : **Toxique, corrosif** : [T, C] – R : [23/24/25-34-48/20/21/22-68] – S : [24/25-26-28-36/37/39-45]

Chloroforme : **Nocif** : [Xn] – R : [22-38-40-48/20/22] – S : [36/37] Les gants de laboratoire ne fournissant pas une protection optimale contre ce produit, on jettera le gant immédiatement s'il vient à être contaminé.

EDTA (poudre) : Irritant : [Xi] – R : [36-52/53] – S : [26-61]

Composants du kit ayant un effet notable : **isothiocyanate de guanidine** dans « RNA Lysis Solution » et « Wash Buffer I ».

Utilisation du kit sous hotte aspirante rejetant les gaz à l'extérieur uniquement. Ne pas mélanger les déchets à de l'eau de Javel ou à des acides. Porter blouse, gants nitrile et lunettes de sécurité durant toute la manipulation à compter de l'étape 10.c).

Manipulation des acides ribonucléiques avec des gants, et sur une zone de travail RNasefree, afin de protéger ceux-ci, très fragiles, de toute contamination extérieure.

9. Documents attachés

10. Réalisation

a) Préparation de tampon ACK :

Peser : - 8.3 g NaCl

- 0.84 g KHCO₃

- 29.3 mg EDTA

Ajuster à pH=7.5 avec de l'acide acétique (ou de l'hydroxyde de sodium)

Ajuster à 1 litre avec de l'eau désionisée à l'aide dans une éprouvette de verre.

Placer dans une bouteille en verre de un litre, et stériliser par autoclavage 20 minutes 121°C.

Ce tampon se stocke à température ambiante.

b) Avant de partir faire le prélèvement des animaux :

Préparer sur glace des tubes de 50ml à fond conique, annotés au marqueur indélébile sur le corps du tube ainsi que sur le bouchon, à raison de 1 tube par extraction.

Mettre le tampon ACK dans la glace. Prévoir au moins 70ml de tampon par extraction.

Préparer de l'éthanol (1ml/échantillon) à 70%, en mélangeant 3 volumes d'eau et 7 volumes d'éthanol absolu.

Ajouter 60ml d'éthanol absolu au tampon de lavage « Wash buffer II » du kit, si cela n'a pas été fait.

c) Prélèvement des chevaux :

Réaliser le prélèvement sanguin à la jugulaire de l'animal, à l'aide d'un tube Vacutainer de 5ml (héparine sodique : bouchon vert). Le tube doit être rempli au maximum.

Retourner le tube au moins trois fois, puis le placer immédiatement sur glace. Noter l'heure du prélèvement.

Rentrer au laboratoire immédiatement à la fin des prélèvements pour procéder à la suite du mode opératoire.

d) Extraction des ARN :

1. S'assurer que le tampon ACK est bien froid, puis mélanger 1 volume de sang pour 10 volumes de tampon (idéalement 4.5ml de sang et 45ml de tampon).

2. Laisser incuber 10 min. sur glace, et vortexer ou retourner au moins deux fois durant l'incubation.

3. Centrifuger 10 min à 400g à 4°C

4. Eliminer le surnageant à la pompe à vide, puis laver le culot par addition de tampon ACK (4x le volume du prélèvement).
 5. Vortexer jusqu'à dissolution complète du culot. **Centrifuger 10 min à 400g à 4°C**
 6. Eliminer le surnageant, ajouter 1ml de Trizol et casser grossièrement le culot par aspiration-refoulement à la pipette. Transférer entièrement dans un microtube 1.5ml autoclavé annoté.
 7. Dissoudre complètement le culot par aspiration-refoulement avec une aiguille 23G stérile, montée sur une seringue stérile de 2ml. Changer aiguille et seringue entre chaque échantillon.
 8. Laisser incubé 5 min. à température ambiante.
 9. Ajouter 0.2ml de Chloroforme. Retourner vigoureusement pendant 15 secondes.
 10. Incuber 2-3 min. à température ambiante, **centrifuger 15 min à 12000g 4°C**.
 11. Transférer la phase supérieure aqueuse (600µl) dans un microtube incolore de 1.5ml autoclavé.
 12. Ajouter 600µl d'éthanol 70%, vortexer. Il faut obtenir une solution homogène
 13. Transférer 700µl sur une colonne « RNA Spin Cartridge » du kit, **centrifuger 15sec à 12000g**. Eliminer le surnageant
 14. Passer le reste du mélange phase aqueuse/Ethanol 70% sur la même colonne, **centrifuger 15sec 12000 x g**. Eliminer le surnageant.
 15. Ajouter 700µl de Wash Buffer I du kit, **centrifuger 15 sec à 12000g**. Eliminer le surnageant
 16. Placer dans un nouveau tube collecteur (fourni)
 17. Ajouter 500µl de Wash Buffer II du kit, **centrifuger 15 sec à 12000g**
 18. Eliminer le surnageant, garder le même tube collecteur.
 19. Ajouter 500µl de Wash Buffer II du kit, **centrifuger 15 sec à 12000g**
 20. Eliminer le surnageant, garder le même tube collecteur puis centrifuger sur la même colonne, à vide, **1 min à 12000g**
 21. Changer le tube collecteur (utiliser un tube 1.5ml du kit), ajouter 35µl d'eau distillée du kit, incubé 1min. à température ambiante, éluer par **centrifugation 2 min. vitesse max**.
 22. Faire une seconde élution en repassant le filtrat sur la colonne. **Centrifuger 2min. vitesse max**.
 23. Conserver l'éluat sur glace, ou congeler pour une utilisation future (-20°C si utilisation sous 7 jours, -70°C si utilisation dans les semaines ou les mois suivants)
- Passer directement 1µl d'échantillon au Nanodrop et faire une dilution de 5µl finaux à 50-200µmol/µl pour faire des analyses d'intégrité de l'ARN sur Bioanalyser (MOLEOPERAT-003).

Transférer dans un tube de 1.5 µl stérile une fraction de 15µl clairement identifié pour réaliser une RT-PCR suivie d'une PCR quantitative en temps réel, ou une hybridation de macropuce à ADN. Congeler les échantillons à -70°C dès que possible pour les utiliser dans les semaines (ou les mois) suivants.

(De Kock et *al*, 2001)

Annexe 9 : Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent)

Ce kit permet de générer des ARN complémentaires fluorescents à partir de 200 à 1000 ng d'ARN totaux à l'origine.

A/ Synthèse et marquage à la Cy3 des ARNc

1° équilibrer les bains marie

37, 65, 40°C + un bain sec à 80°C

2° Décongeler les échantillons et les kits

3° préparer les dilutions du spike mix

Vortexer la dilution au 1:20, déjà prête

diluer 2µl de dilution 1:20 dans 50 final (1:500) : 2µl + 48µl tampon de dilution

diluer 22µl de dilution 1:500 dans 110 final (1:2500) : 22µl + 88µl tampon de dilution

BIEN VORTEXER ENTRE LES DILUTIONS

4° Préparer, en tube 1,5ml, avec du spike mix au 1:2500

	1 ech	25 ech
µl eau	0,3	7,5
µl spike mix	5	125
T7 promot primer	1,2	30

Distribuer 7,5µl de ce mix par tube, puis ajouter 5µl d'ARN à 0,2µg/µl

Si les concentrations des ARN ne sont pas celles-ci, ne pas utiliser ce protocole, mais se reporter à celui fourni par le fabriquant.

Incuber à 65°C 10 minutes, puis placer sur glace 5 minutes.

5° Durant l'incubation, préparer le mix suivant

préchauffer le 5x 1st strand buffer à 80°C 3-4 minutes.

	1 ech	25 ech
5x 1st strand buf	4	100
0,1 M DTT	2	50
10mM dNTP mix	1	25
MMLV-RT	1	25
RNase inh	0,5	12,5

6° centrifuger brièvement les échantillons pour les remettre bien au fond du tube, puis ajouter 8,5µl par tube du mix préparé. Homogénéiser par pipetage.

7° Incuber 2h à 40°C, puis 10 minutes à 65°C. Placer sur glace 5 minutes. Centrifuger brièvement.

8° Pendant l'incubation à 65°C, préparer le mix suivant :

	1 ech	25 ech
eau	15,3	382,5
4x transcription buf	20	500

0,1 M DTT	6	150	
NTP mix	8	200	
50% PEG	6,4	160	(attention : volume mix = 1500µl)
RNase Inh	0,5	12,5	
Inorganic pyroPase	0,6	15	
T7 RNA Polymeras	0,8	20	
Cy3-CTP	2,4	60	

9° Distribuer 60µl de ce mix par tube, mélanger à la pipette, puis incuber 40°C 2 heures.

B/ Purification des cRNA fluorescents (Rneasy QIAgen)

1° Ajouter 20µl d'eau nucléase-free aux échantillons.

2° Ajouter 350µl de tampon RLT, et homogénéiser à la pipette.

3° Ajouter 250µl d'EtOH absolu et homogénéiser à la pipette. Ne pas centrifuger!

4° Transférer les 700µl sur une colonne du kit. Centrifuger vitesse max 30 sec à 4°C.

5° Eliminer l'éluat et le tube, transférer sur un nouveau tube collecteur du kit. Distribuer 500µl de tampon ; RPE contenant de l'éthanol, puis centrifuger 30 sec à 4°C vitesse max. Eliminer l'éluat, mais pas le tube collecteur.

6° Ajouter à nouveau 500µl de RPE, et centrifuger 60 sec à 4°C vitesse max.

7° Transférer la colonne vide dans un tube 1,5ml (non fourni) et centrifuger vitesse max 60 sec 4°C.

8° Placer la colonne sur un tube 1,5ml du kit, annoté, ajouter 30µl d'eau et attendre 60 sec.

Centrifuger 30 sec à 4°C vitesse max

Garder l'éluat sur glace puis procéder au dosage au Nanodrop ND1000

Annexe 10 : Protocole d'hybridation, de lavage et de lecture des arrays oligonucléotides 4x44K Agilent

Avec l'aimable autorisation de Pascal Martin.

A penser à faire : allumer le four à 60°C, marquer les chambres à hybridation, porter des gants sans talc, noter la correspondance lame/chambre, prévoir de la carboglace si les cRNA doivent être congelés

Etape n°1 : Préparation des solutions

10X Blocking Agent : ajouter 1250µL d'eau nuclease-free (kit Qiagen) au culot du "lyophilised 10X Blocking agent". Mélanger doucement au vortex. Chauffer éventuellement 4-5 min à 37°C. Centrifuger 5-10 secondes pour récupérer le matériel adhérent au tube ou au bouchon. Stockage possible à -20°C à l'abri de la lumière pour 2 mois environ. En cas de congélation, répéter l'étape de centrifugation à la décongélation.

Etape n°2 : Préparation des échantillons pour l'hybridation

- 1) Préparer les tubes à vis au préalable avec la quantité d'eau nuclease-free nécessaire à chaque mix (vers 15h)
- 2) Equilibrer le bain marie à 60°C (vers 16h)
- 3) Pour chaque puce, préparer le mix suivant :

Dans un tube 1,5 mL nuclease-free, mélanger les éléments suivants :

825 ng de cRNA marqué Cyanine 3

825 ng de cRNA marqué Cyanine 5

11 µL de 10X Blocking Agent

Eau nuclease-free qsp 52,8 µL (attention : enlever les 11 µL de Blocking Agent)

2,2 µL de 25X Fragmentation Buffer

Volume final : 55 µL

- 4) Mélanger doucement en pipetant et incuber **30 minutes exactement à 60°C** au bain marie à l'obscurité

Pour 5 puces : préparer les 4 mix de la 1ere puce dans la glace puis les mettre à 60°C

Préparer les 4 mix de la 2eme puce puis les mettre à 60°C environ 15 min après les premiers (laps de temps nécessaire au dépôt des mix sur la 1ere puce)

Préparer les mix de la 3eme puce puis les mettre à 60°C juste avant de ressortir les mix de la 1ere puce (vers 30 min)

5) Dans chaque tube des mix de la 1ere puce, ajouter **55 µL de 2X Gex Hybridization Buffer HI-RPM** pour arrêter la réaction de fragmentation. Bien mélanger en pipetant (ne pas vortexer) mais faire attention de ne pas faire de bulles.

Volume final : 110 µL

6) Centrifuger 1 min à 13 000 rpm

7) Déposer sur la puce (cf. étape n°3). Noter l'heure de mise au four à hybridation de la 1ere puce

8) Procéder de même avec chacun des mix

9) Reprendre l'étape 3 pour les 2 dernières puces

Etape n°3 : Préparation des chambres d'hybridation

Réalisation de l'hybridation.

N'UTILISER QUE DES GANTS SANS TALC. Voir figure 2 pour les pièces composant les chambres à hybridation.

- 1) Désassembler la chambre à hybridation en ouvrant l'ECROU (sens inverse des aiguilles d'une montre), en enlevant le PORTE ECROU en le faisant glisser le long de la chambre et en enlevant le COUVERCLE DE LA CHAMBRE. Marquer la chambre à hybridation (voir figure 3) et noter dans le cahier de labo la correspondance entre la chambre d'hybridation et l'array.
- 2) Mettre en place une lame-joint (GASKET SLIDE, voir figure 4) propre dans la BASE DE LA CHAMBRE avec l'inscription AGILENT vers le haut et aligné avec la section rectangulaire de la BASE DE LA CHAMBRE (voir figure 5). Ne jamais toucher la surface de la lame-joint.
- 3) Pipeter doucement la totalité de la solution d'hybridation **en évitant les bulles**. Utiliser **100 µL de la solution d'hybridation 1X** (sur 110 µL total) pour chaque microarray 44K. Déposer doucement la solution au centre du puits défini par la lame-joint en partant d'un bord de la lame-joint et en allant vers l'autre sans toucher le support (voir figure 6). Ne bouger en aucun cas la BASE DE LA CHAMBRE (pour éviter les fuites).
- 4) Retirer le MICROARRAY de son emballage et le tourner pour que le code barre numérique (au verso de l'inscription AGILENT, voir figure 1) soit tourné vers le

haut lorsque l'on descend doucement le microarray vers la GASKET SLIDE (voir figure 7). Descendre doucement le microarray en l'alignant sur les 4 guides de la BASE DE LA CHAMBRE. Une fois aligné et légèrement au dessus de la GASKET SLIDE, placer délicatement le MICROARRAY sur la GASKET SLIDE. Vérifier rapidement l'alignement et réaligner très rapidement si nécessaire. Ne bouger en aucun cas la BASE DE LA CHAMBRE (pour éviter les fuites).

- 5) Placer le COUVERCLE DE LA CHAMBRE dans le bon sens sur le sandwich de lame (voir figure 8) et glisser le PORTE ECROU (en passant par le côté rond de la chambre) jusqu'à ce qu'il soit stoppé (voir figure 9). Visser l'écrou à la main en tournant dans le sens horaire et faire $\frac{1}{4}$ de tour supplémentaire.
- 6) Prendre la chambre en main, la placer verticalement et tourner 2-3 fois doucement la chambre dans le sens horaire pour mouiller le joint.
- 7) Inspecter le sandwich de lame et vérifier l'absence de petites bulles immobiles (voir figure 10). En cas de présence de petites bulles immobiles, taper doucement d'un côté de la chambre sur une surface solide et la tourner verticalement à nouveau. Vérifier que le niveau de liquide dépasse la moitié de la chambre d'hybridation afin que tout l'array soit exposé au mix d'ARN.
- 8) Assembler les autres chambres si nécessaire. Remarque : il est possible de déposer la solution d'hybridation sur 4-8 lames et de déposer ensuite les microarrays, mais lorsqu'un microarray est déposé, il est impératif de finir l'assemblage de la chambre d'hybridation immédiatement pour éviter les fuites de liquide.
- 9) Charger les chambres dans le four en les équilibrant (voir figure 11)
- 10) Régler le four sur **10 rpm**
- 11) Hybrider **17 heures à 60°C**
- 12) Chauffer le Gene expression Wash Buffer 2 et Stabilization and drying solution (SDS) pendant la nuit à 37°C

Etape n°4 : Lavage des puces

Matériel nécessaire : 4 bains de marquages (staining dishes), 3 barreaux aimantés, 3 agitateurs magnétiques, Wash solution 1, Wash solution 2, Stabilization and Drying solution (SDS), 1 pince en plastique

- 1) Avant la fin de l'hybridation, préparer 4 bains de marquage sous une sorbonne pour les lavages : si place limitée sous sorbonne, y mettre préférentiellement les bacs d'acétonitrile et de SDS
 - Dans un 1^{er} bain de marquage (volume mini=250 mL pour faciliter le désassemblage) ajouter de la **Wash solution 1** à température ambiante

- Dans un 2^{ème} bain de marquage, ajouter un **rack pour lame** et un **barreau aimanté** et placer le bain sur un agitateur magnétique. Couvrir le rack pour lames avec de la **Wash solution 1** (env. 250 mL) à température ambiante
 - Dans un 3^{ème} bain de marquage, ajouter un **barreau aimanté** et placer le bain sur un agitateur magnétique.
 - Dans le 4^{ème} bain de marquage, ajouter un **barreau aimanté** et placer le bain sur un agitateur magnétique. Ajouter de l'acétonitrile suffisamment pour couvrir un rack pour lame (env. 250 mL)
 - Dans le 5^{ème} bain de marquage, ajouter un **barreau aimanté** et placer le bain sur un agitateur magnétique. Ajouter de la **SDS** suffisamment pour couvrir un rack pour lame (env. 250 mL)
- 2) Retirer **UNE SEULE** chambre à hybridation du four (pour éviter le refroidissement de la chambre à hybridation avant les lavages). Vérifier l'absence de bulles immobiles (voir figure 10)
 - 3) Placer la chambre à désassembler sur une surface plane et défaire l'**ECROU** en dévissant dans le sens antihoraire (voir figure 12)
 - 4) Faire glisser le **PORTE-ECROU** et enlever le **COUVERCLE** de la chambre.
 - 5) Retirer le **SANDWICH** de lames (avec des gants) en prenant les lames par leurs extrémités. Tenir le microarray lors du transfert dans le premier bain (voir figure 12)
 - 6) Sans lâcher le **SANDWICH** de lames, immerger les deux lames dans le **premier bain** contenant la **Wash solution 1**
 - 7) Les deux lames étant **TOTALEMENT SUBMERGEES** dans la solution de lavage, écarter les deux lames l'une de l'autre à l'aide d'une pince plastique **COTE CODE BARRE UNIQUEMENT**. Pour cela, glisser la pince entre les deux lames (côté code barre) et tourner dans un sens et dans l'autre la pince plastique pour écarter les deux lames. Laisser la **GASKET SLIDE** tomber au fond du bain (voir figure 13)
 - 8) Retirer rapidement le microarray et le placer dans le rack pour lames situé dans le bain n°2 (Wash solution 1). Minimiser l'exposition de la lame à l'air et ne toucher que les bords ou le code barre de la lame !!

Lorsque la première chambre a été désassemblée, il est possible de désassembler d'autres chambres. Cependant, ne jamais excéder 4 lames sur un rack pouvant en accueillir 10 (ou 10 lames sur un rack pouvant en accueillir 30). Dans tous les cas, s'assurer qu'il y a au moins un espace libre entre 2 lames et un espace libre entre une lame et le bord du rack (afin d'assurer une bonne homogénéité de lavage)

- 9) Une fois que toutes les lames sont sur le rack situé dans le deuxième bain, allumer l'agitateur magnétique du **bain n°2 (Wash solution 1)** contenant les lames (vitesse moyenne-setting 4) et **laver les lames 1 minute** à température ambiante
- 10) Pendant ce temps, remplir le bain n°3 de Wash solution 2 à 37°C, allumer l'agitateur magnétique à une position moyenne (setting 4) ainsi que celui du bain n°4 (SDS) à une position moyenne à forte.
- 11) Transférer le rack de lames dans le **bain n°3 (Wash solution 2)** et **laver les lames pendant 1 minute. LE TIMING DE CETTE ETAPE EST CRUCIAL.**
- 12) Enlever le rack portant les lames de la Wash solution 2 en l'inclinant légèrement pour éliminer le maximum de solution et éviter le carry-over vers le bain d'acétonitrile. **TRANSFERER RAPIDEMENT** (dans les 10 sec) le rack portant les lames dans le **bain n°4** et **laver les lames pendant 1 min**
- 13) Transférer dans le dernier bain (**n°5 SDS**) et attendre **30 s**
- 14) Laisser l'agitateur magnétique en marche en enlevant le rack portant les lames **LENTEMENT** et à **VITESSE CONSTANTE** du bain n°5. Cela doit prendre entre 5 et 10 secondes de retirer le rack de la solution. Les lames sèches sont prêtes à être scannées ou à être stockées à l'abri de la lumière sous azote en attendant le scan.

REMARQUE : *la Stabilization and Drying Solution peut être utilisée en moyenne jusqu'à 5 fois avant d'être remplacée*

Lavage et stockage de la Stabilization and Drying Solution

- 1) Travailler sous hotte et avec des gants. Laver le rack pour lames et le bain n°4 ayant été en contact avec la Stabilization and Drying Solution avec un solvant organique miscible dans l'eau (ex : acétonitrile, acetone ou ethanol). Terminer par un lavage à l'eau désionisée avant réutilisation.
- 2) Remettre la Stabilization and Drying Solution dans une bouteille en verre fumé à l'aide d'un entonnoir en laissant au moins 30% d'espace à la surface du liquide (ex 500 mL dans une bouteille de 700 mL). Stocker cette solution à l'abri de la lumière.
- 3) L'élimination de la Stabilization and Drying Solution se fait avec les solvants inflammables (comme les solvants HPLC ou les déchets de phénol)

Stockage des lames

Les lames peuvent être stockées dans une boîte en polypropylène pour lames sans inserts en polystyrène ou en liège à l'abri de la lumière et sous azote. Eviter le stockage en dessiccateur sous vide qui provoque du quenching.

Nettoyage des chambres à hybridation

Eliminer les GASKET SLIDES avec les objets coupants.

Laver abondamment les chambres à hybridation. Rincer soigneusement en cas d'utilisation de détergent ou de solution contenant des RNAses. Faire sécher toutes les pinces séparément et complètement puis réassembler les chambres et les stocker à l'abri des chocs et de la poussière (tiroir ou boîte en plastique par exemple) (voir figure 14)

Etape n°5 : Scan des lames avec le scanner Genepix 4000B (plateforme INSA)

Insérer la lame dans le scanner, code barre de la lame visible et vers soi.

Faire un préscan de la lame et régler le gain (PMT) de chaque couleur (vert et rouge) afin que les deux soient équilibrés (se mettre sur la fenêtre histogrammes).

Zoomer pour déterminer d'éventuels points saturés.

Préscanner éventuellement les autres lames pour vérifier que le réglage est bon pour les autres.

Scanner à 5 μ m.

Zoomer et vérifier qu'aucun spot ne soit saturé (point jaune ou blanc) sinon, diminuer le gain (PMT) de chaque couleur et rescanner la lame.

Enregistrer l'image en tif multicouche : noter le n° de la puce et le PMT de chaque couleur.

Attention : si comparaison entre lames nécessaire, scanner les autres lames avec le même réglage !

Illustrations

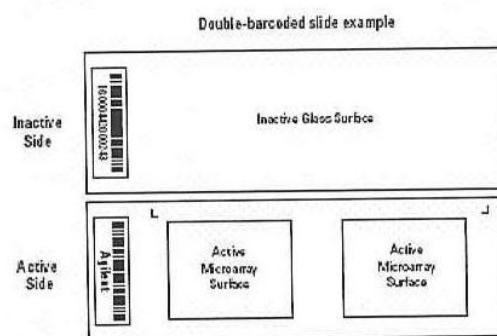


Figure 1 : face active et face inactive des lames

La face active (i.e. qui porte les oligos) est celle qui porte l'inscription AGILENT. Ne jamais toucher la surface des microarrays



Figure 2 : Eléments de la chambre à hybridation



Figure 3 : Marquage des chambres à hybridation



Figure 4 : Sortir la GASKET SLIDE de son emballage

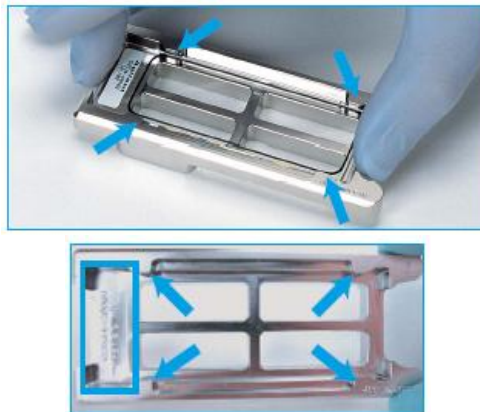


Figure 5 : Mise en place de la GASKET SLIDE. L'inscription AGILENT est placée vers le haut. S'assurer de l'absence d'entrebaillement entre la lame et la chambre à hybridation. Les flèches indiquent les guides situés sur la base de la chambre



Figure 6 : Dépôt de la solution d'hybridation



Figure 7 : Mise en place du microarray

L'inscription AGILENT est placée vers le bas. S'assurer de l'absence d'entrebâillement entre le microarray et la GASKET SLIDE. S'assurer qu'aucune des deux lames ne repose sur un bord de la chambre à hybridation.



Figure 8 : Mise en place du couvercle de la chambre



Figure 9 : Fermeture de la chambre



Figure 10 : Vérification des bulles



Figure 11 : Chargement dans le four

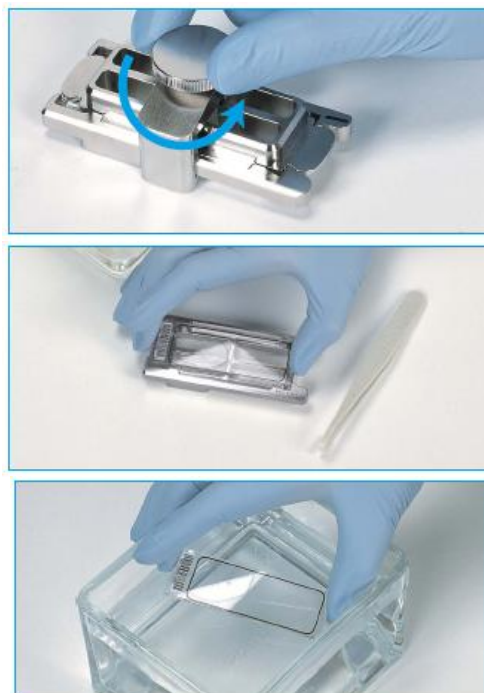


Figure 12 : Désassemblage de la chambre

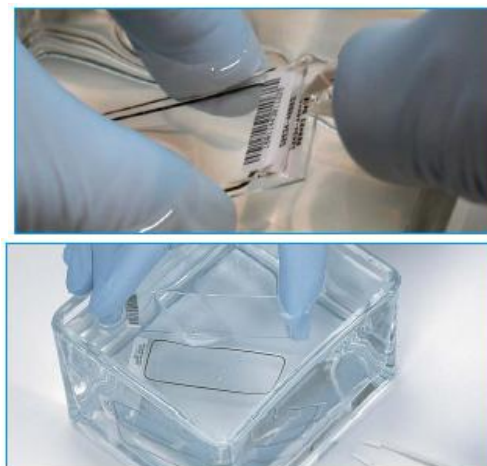


Figure 13 : Du bain n°1 au bain n°2



Figure 14 : Nettoyage et stockage des chambres à hybridation

Annexe 11: Listes des spots déclarés différentiellement exprimés

Q1 : Liste des 129 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	log(Ratio)	p-value	Adjusted p-value
Lgals8	NM_053862	Rattus norvegicus lectin, galactoside-binding, soluble 8 (Lgals8), mRNA [NM_053862]	0,641416543	9,70E-06	0,029867746
Isg20	NM_001008510	Rattus norvegicus interferon stimulated exonuclease 20 (Isg20), mRNA [NM_001008510]	0,635803759	1,40E-05	0,029867746
Baz2b_predicted	ENSRNOT00000031455	Rattus norvegicus similar to KIAA1476 protein (LOC317627), mRNA [NM_229225]	0,658224418	1,65E-05	0,029867746
Olr132_predicted	NM_001001273	Rattus norvegicus olfactory receptor 132 (predicted) (Olr132_predicted), mRNA [NM_001001273]	0,698313919	3,43E-05	0,046637168
Als2cr13_predicted	ENSRNOT00000031261	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FJ38771 (LOC363236), mRNA [XM_343576]	0,775486925	6,79E-05	0,073815943
Hook3	AY310154	Rattus norvegicus Ac1288 mRNA, complete cds. [AY310154]	0,477312246	0,000285718	0,210200942
Mafk	NM_145673	Rattus norvegicus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian) (Mafk), mRNA [NM_145673]	0,713982846	0,000396568	0,210200942
RGD1561055_predicted	ENSRNOT00000049856	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Ferritin light chain (Ferritin L subunit) (predicted) (RGD1560687_predicted), mRNA [NM_576192]	0,402456686	0,000327614	0,210200942
Ogt	NM_017107	Rattus norvegicus O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) (Ogt), mRNA [NM_017107]	0,391796733	0,000347823	0,210200942
Mrap_predicted	ENSRNOT00000036027	PREDICTED: Rattus norvegicus melanocortin 2 receptor accessory protein (predicted) (Mrap_predicted), mRNA [XM_213659]	0,660043689	0,000436006	0,23350718
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,502791287	0,000472252	0,23350718
Nrn1	NM_053346	Rattus norvegicus neuritin (Nrn1), mRNA [NM_053346]	-0,636951647	0,00064366	0,291738788
LOC365047	XR_005908	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Ferritin light chain 1 (Ferritin L subunit 1) (LOC365047), mRNA [XR_005908]	0,401372487	0,000826891	0,329925696
Ftl1	NM_022500	Rattus norvegicus ferritin light chain 1 (Ftl1), mRNA [NM_022500]	0,471793463	0,000886211	0,329925696
Aga	NM_001031641	Rattus norvegicus aspartylglucosaminidase (Aga), mRNA [NM_001031641]	-0,396286899	0,001027792	0,329925696
Max	NM_022210	Rattus norvegicus Max protein (Max), mRNA [NM_022210]	0,480568459	0,00103908	0,329925696
Mrpl18_predicted	ENSRNOT00000020064	PREDICTED: Rattus norvegicus mitochondrial ribosomal protein L18 (predicted) (Mrpl18_predicted), mRNA [XM_214751]	-0,38827791	0,001106396	0,329925696
Sirt7_predicted	XM_221204	PREDICTED: Rattus norvegicus sirtuin 7 (silent mating type information regulation 2, homolog) 7 (S. cerevisiae) (predicted) (Sirt7_predicted), mRNA [XM_221204]	-0,457349771	0,001247317	0,329925696
MGC109491	NM_001009709	Rattus norvegicus similar to 1110007F12Rik protein (MGC109491), mRNA [NM_001009709]	0,477587977	0,001357283	0,329925696
AA858875	AA858875	AA858875 UI-R-A0-bd-b-04-O-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bd-b-04-O-UI 3' similar to gb [AA858875]	0,612201424	0,0014162	0,329925696
ENSRNOT00000040235	ENSRNOT00000040235	ENSRNOT00000040235 RAB5C, member RAS oncogene family (predicted) (Rab5c_predicted), mRNA [XM_213463]	0,298245214	0,001426422	0,329925696
Dazap2	NM_001013107	Rattus norvegicus DAZ associated protein 2 (Dazap2), mRNA [NM_001013107]	0,29106663	0,001488498	0,329925696
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,543873471	0,001595536	0,329925696
Dynl12	NM_080697	Rattus norvegicus dynein light chain LC8-type 2 (Dynl12), mRNA [NM_080697]	0,511936001	0,00167736	0,329925696
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,438943352	0,001754193	0,329925696
Cdc42	NM_171994	Rattus norvegicus cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) (Cdc42), mRNA [NM_171994]	0,289536246	0,001781998	0,329925696
Adora3	NM_012896	Rattus norvegicus adenosine A3 receptor (Adora3), mRNA [NM_012896]	0,327998821	0,001974146	0,329925696
Ftl1	NM_022500	Rattus norvegicus ferritin light chain 1 (Ftl1), mRNA [NM_022500]	0,417910405	0,002162145	0,329925696
RGD1562337_predicted	ENSRNOT00000051158	AY769435 mesoderm induction early response 1 N1 beta (Mus musculus) (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (51%) [TC612555]	0,384171098	0,00216649	0,329925696
Irf2_predicted	NM_001047086	Rattus norvegicus interferon regulatory factor 2 (predicted) (Irf2_predicted), mRNA [NM_001047086]	0,530427049	0,002194026	0,329925696
LOC313386	XR_006182	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ubiquitin specific protease 15 (LOC313386), mRNA [XR_006182]	0,363456195	0,002230173	0,329925696
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,706364452	0,002250931	0,329925696
Nkx2-2_predicted	ENSRNOT00000017364	PREDICTED: Rattus norvegicus NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) (predicted) (Nkx2-2_predicted), mRNA [XM_345446]	-0,52154604	0,002328879	0,329925696
Src	NM_031977	Rattus norvegicus Rous sarcoma oncogene (Src), mRNA [NM_031977]	0,463917	0,002354786	0,329925696
Atp6v1e1	NM_198745	Rattus norvegicus ATPase, H+ transporting, V1 subunit E isoform 1 (Atp6v1e1), mRNA [NM_198745]	0,30861105	0,002372415	0,329925696
XM_235474	XM_235474	Rattus norvegicus hypothetical LOC315130 (LOC315130), mRNA [XM_235474]	0,391079934	0,002377036	0,329925696
Mkln1	NM_031359	Rattus norvegicus muskulin 1, intracellular mediator containing kelch motifs (Mkln1), mRNA [NM_031359]	0,276349374	0,002411045	0,329925696
Rbbp6	ENSRNOT00000035770	Rbbp6 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB85] [ENSRNOT00000035770]	0,346901429	0,002495241	0,329925696
XM_238783	XM_238783	Rattus norvegicus similar to [Ascaris lumbricoides mRNA sequence.], gene product (LOC308494), mRNA [XM_238783]	-0,339557051	0,002931388	0,329925696
Dgat2	NM_001012345	Rattus norvegicus diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse) (Dgat2), mRNA [NM_001012345]	0,367217927	0,002956267	0,329925696
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,700186897	0,002969933	0,329925696
Stat5b	NM_022380	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA [NM_022380]	0,461996357	0,002985687	0,329925696
Trpm2	NM_001011559	Rattus norvegicus transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2 (Trpm2), mRNA [NM_001011559]	0,474940164	0,003000009	0,329925696
Ppp2r5a_predicted	ENSRNOT00000000078	PREDICTED: Rattus norvegicus protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform (predicted) (Ppp2r5a_predicted), mRNA [XM_232413]	0,433268788	0,00308939	0,329925696
Ifit2	NM_001024753	Rattus norvegicus interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (Ifit2), mRNA [NM_001024753]	0,76433487	0,003145317	0,329925696
Rassf2	NM_001037096	Rattus norvegicus Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 (Rassf2), mRNA [NM_001037096]	0,388096732	0,003170522	0,329925696
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,532332189	0,003180798	0,329925696
LOC294762	ENSRNOT00000060595	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8 (LOC294762), mRNA [XM_215491]	0,350114338	0,003183028	0,329925696
Cdc42	NM_171994	Rattus norvegicus cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) (Cdc42), mRNA [NM_171994]	0,243225165	0,003201274	0,329925696
G1p2_predicted	ENSRNOT00000039263	PREDICTED: Rattus norvegicus interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted) (G1p2_predicted), mRNA [XM_216605]	1,004813771	0,003207954	0,329925696
LOC679126	XM_001054498	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to SMAD-interacting zinc finger protein 2, transcript variant 3 (LOC679126), mRNA [XM_001054498]	-0,610565343	0,003333447	0,329925696
Cds2	NM_053643	Rattus norvegicus CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2 (Cds2), mRNA [NM_053643]	0,445794681	0,003348831	0,329925696
CB718208	CB718208	AMGNNUC:NRDGI-00176-F10-A nrdg1 (10855) Rattus norvegicus cDNA clone nrdg1-00176-f10 5', mRNA sequence [CB718208]	-0,341843526	0,003366447	0,329925696
Csnk1d	NM_139060	Rattus norvegicus casein kinase 1, delta (Csnk1d), mRNA [NM_139060]	0,31497518	0,003459638	0,329925696
ENSRNOT00000013761	ENSRNOT00000013761	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 1 (predicted) (RGD1564762_predicted), mRNA [XM_232771]	0,383368787	0,003471827	0,329925696
Arhgap9_predicted	BC107938	Rattus norvegicus Arhgap9_predicted protein, mRNA (cDNA clone MGC:125000 IMAGE:7378387), complete cds. [BC107938]	0,354374997	0,003477224	0,329925696
Fth1	NM_012848	Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1), mRNA [NM_012848]	0,357551325	0,003538189	0,329925696
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,517068099	0,003545046	0,329925696
Tbc1d20	NM_001004281	Rattus norvegicus TBC1 domain family, member 20 (Tbc1d20), mRNA [NM_001004281]	0,350475833	0,003578896	0,329925696
Atad1	AY325215	Rattus norvegicus Ab2-088 mRNA, complete cds. [AY325215]	0,385247882	0,003696059	0,335047751
ENSRNOT00000048838	ENSRNOT00000048838	Unknown	0,428976406	0,003867012	0,343515904
Mesdc1	NM_001013149	Rattus norvegicus mesoderm development candidate 1 (Mesdc1), mRNA [NM_001013149]	-0,283866238	0,003972061	0,343515904
Cugbp2	NM_017197	Rattus norvegicus CUG triplet repeat, RNA binding protein 2 (Cugbp2), mRNA [NM_017197]	0,247893096	0,003978949	0,343515904
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,650009489	0,00438139	0,366816289
Slc6a8	NM_017348	Rattus norvegicus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (Slc6a8), mRNA [NM_017348]	0,558746007	0,004383721	0,366816289
Limk2	NM_024135	Rattus norvegicus LIM motif-containing protein kinase 2 (Limk2), mRNA [NM_024135]	0,519005281	0,004622176	0,380909334

Q1 : Liste des 129 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	log(Ratio)	p-value	Adjusted p-value
ENSRNOT00000059328	ENSRNOT00000059328	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC680615), mRNA [XM_001058007]	0,363222739	0,004808909	0,384589182
Ptk7_predicted	XM_001066019	PREDICTED: Rattus norvegicus serum response factor (predicted) (Srf_predicted), mRNA [XM_001066019]	-0,367545202	0,004846893	0,384589182
ENSRNOT000000046191	ENSRNOT000000046191	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC306962), mRNA [XM_225372]	0,36418052	0,004915772	0,384589182
RGD1311474	NM_001010945	Rattus norvegicus similar to transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha (RGD1311474), mRNA [NM_001010945]	0,349450824	0,00496315	0,384589182
XM_234370	XM_234370	Rattus norvegicus similar to Ab2-162 (LOC299244), mRNA [XM_234370]	0,220120085	0,005020377	0,384589182
LOC302495	XR_006183	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC302495 (LOC302495), mRNA [XR_006183]	0,324224421	0,005108974	0,385940386
Mageh1	NM_001013250	Rattus norvegicus melanoma antigen, family H, 1 (Mageh1), mRNA [NM_001013250]	-0,287959112	0,005215544	0,387377506
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,574468143	0,005306955	0,387377506
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,532031451	0,005341664	0,387377506
Cnot6l_predicted	ENSRNOT00000002843	PREDICTED: Rattus norvegicus CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like (predicted) (Cnot6l_predicted), mRNA [XM_341191]	0,318021581	0,00564791	0,39065993
ENSRNOT00000050740	ENSRNOT00000050740	LRRGT00061. [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q6TU13] [ENSRNOT00000050740]	0,349861889	0,005798148	0,39065993
Npepps	ENSRNOT000000031045	Npepps protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q38809] [ENSRNOT000000031045]	0,370290679	0,005844892	0,39065993
March7	NM_001012087	Rattus norvegicus membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (March7), mRNA [NM_001012087]	0,393321775	0,005930708	0,39065993
Chst2_predicted	ENSRNOT000000056689	Rattus norvegicus similar to carbohydrate sulfotransferase 2; N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase (LOC367145), mRNA [XM_345970]	0,462272459	0,005974824	0,39065993
ENSRNOT00000017422	ENSRNOT00000017422	Mago-nashi-like proliferation-associated protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q27W02] [ENSRNOT00000017422]	-0,691282823	0,005986152	0,39065993
A_44_P659805	A_44_P659805	Unknown	0,270993521	0,006006968	0,39065993
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,495631192	0,006072462	0,39065993
Sar1a	NM_001007739	Rattus norvegicus SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae) (Sar1a), mRNA [NM_001007739]	0,331709909	0,006080148	0,39065993
Lta4h	NM_001030031	Rattus norvegicus leukotriene A4 hydrolase (Lta4h), mRNA [NM_001030031]	-0,275115216	0,006284763	0,39065993
Hbp1	NM_013221	Rattus norvegicus high mobility group box transcription factor 1 (Hbp1), mRNA [NM_013221]	0,2304132	0,006288101	0,39065993
Ibrcd3_predicted	ENSRNOT000000000135	PREDICTED: Rattus norvegicus IBR domain containing 3 (predicted) (Ibrcd3_predicted), mRNA [XM_233761]	0,486344921	0,006342356	0,39065993
Atg7	NM_001012097	Rattus norvegicus autophagy-related 7 (yeast) (Atg7), mRNA [NM_001012097]	-0,312866777	0,006457373	0,39065993
Pebp1	NM_017236	Rattus norvegicus phosphatidylethanolamine binding protein 1 (Pebp1), mRNA [NM_017236]	-0,292716578	0,006547403	0,39065993
Unr	NM_054006	Rattus norvegicus upstream of NRAS (Unr), mRNA [NM_054006]	0,278590459	0,006637737	0,39065993
RGD1308877_predicted	ENSRNOT00000028893	similar to CGI-09 protein (LOC365444), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_005933] [ENSRNOT00000028893]	-0,267069074	0,006647343	0,39065993
Zfp265	NM_031616	Rattus norvegicus zinc finger protein 265 (Zfp265), mRNA [NM_031616]	-0,600522691	0,006653325	0,39065993
Rps5	AA819521	AA819521 UI-R-A0-bf-e-02-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-bf-e-02-0-UI 3' similar to emb [AA819521]	-0,351360922	0,006716088	0,39065993
RGD1307393	NM_001014078	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC9907 (RGD1307393), mRNA [NM_001014078]	-0,318888719	0,006872284	0,39065993
Hadhb	NM_133618	Rattus norvegicus hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit (Hadhb), mRNA [NM_133618]	-0,370771986	0,006883431	0,39065993
Hbp1	NM_013221	Rattus norvegicus high mobility group box transcription factor 1 (Hbp1), mRNA [NM_013221]	0,290716768	0,007066445	0,39065993
Car1_predicted	ENSRNOT00000014267	PREDICTED: Rattus norvegicus carbonic anhydrase 1 (predicted) (Car1_predicted), mRNA [XM_226922]	0,262171466	0,007149599	0,39065993
Pspn	NM_013014	Rattus norvegicus persephin (Pspn), mRNA [NM_013014]	-0,292277188	0,007256975	0,39065993
RGD1564490_predicted	XM_577254	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Coronin, actin binding protein 1C (predicted) (RGD1564490_predicted), mRNA [XM_577254]	-0,267180494	0,0072643	0,39065993
A_44_P462018	A_44_P462018	Unknown	0,24899247	0,007310725	0,39065993
Dyrk1a	NM_012791	Rattus norvegicus dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A (Dyrk1a), mRNA [NM_012791]	0,335396876	0,007337138	0,39065993
ENSRNOT00000019916	ENSRNOT00000019916	Rattus norvegicus similar to chromosome 9 open reading frame 19; 17kD fetal brain protein (LOC362509), mRNA [XM_342827]	0,430226594	0,007395379	0,39065993
Polb	NM_017141	Rattus norvegicus polymerase (DNA directed), beta (Polb), mRNA [NM_017141]	0,268405544	0,007449774	0,39065993
Bcl2l2	NM_021850	Rattus norvegicus Bcl2-like 2 (Bcl2l2), mRNA [NM_021850]	-0,239441788	0,007469872	0,39065993
Vcl_predicted	XM_223781	PREDICTED: Rattus norvegicus vinculin (predicted) (Vcl_predicted), mRNA [XM_223781]	-0,26808069	0,007545404	0,390851921
RGD1562339_predicted	XM_579785	PREDICTED: Rattus norvegicus RGD1562339 (predicted) (RGD1562339_predicted), mRNA [XM_579785]	-0,232111993	0,00789655	0,402257364
Prkaa1	NM_019142	Rattus norvegicus protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit (Prkaa1), mRNA [NM_019142]	0,337312274	0,008028899	0,402257364
Rbbp6	ENSRNOT000000035770	Rbbp6 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB85] [ENSRNOT000000035770]	0,293202345	0,00805412	0,402257364
Cbl27	BC061751	Rattus norvegicus androgen receptor-related apoptosis-associated protein CBL27, mRNA (cDNA clone IMAGE:5600134), complete cds. [BC061751]	0,213050217	0,008101117	0,402257364
CA505434	CA505434	CA505434 UI-R-FS1-cqf-i-18-0-UI.s1 NCI_CGAP_FS1 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7362236 3', mRNA sequence [CA505434]	-0,357471758	0,008226918	0,402257364
LOC682543	NM_001061959	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC682543), mRNA [XM_001061959]	0,358557444	0,008257409	0,402257364
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,467728071	0,008303633	0,402257364
Tox_predicted	ENSRNOT00000014661	Rattus norvegicus similar to thymus high mobility group box protein TOX (LOC362481), mRNA [XM_342800]	0,2340077	0,00836561	0,402257364
Ptpn1	NM_012637	Rattus norvegicus protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1 (Ptpn1), mRNA [NM_012637]	0,272608576	0,008431208	0,402257364
Rbbp7	NM_031816	Rattus norvegicus retinoblastoma binding protein 7 (Rbbp7), mRNA [NM_031816]	-0,262204616	0,008824065	0,417339928
Vcpip1	NM_176857	Rattus norvegicus valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1 (Vcpip1), mRNA [NM_176857]	0,29810297	0,009064848	0,419389152
RGD1309748_predicted	ENSRNOT000000003439	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to CG4768-PA (predicted) (RGD1309748_predicted), mRNA [XM_220139]	0,268068636	0,009098662	0,419389152
Dusp6	NM_053883	Rattus norvegicus dual specificity phosphatase 6 (Dusp6), mRNA [NM_053883]	-0,315646992	0,009104935	0,419389152
Ypel5	NM_001035221	Rattus norvegicus yippee-like 5 (Drosophila) (Ypel5), mRNA [NM_001035221]	0,263596426	0,009308308	0,419389152
A_44_P821841	A_44_P821841	Unknown	0,244477189	0,009333326	0,419389152
Lrrc48	NM_001013857	Rattus norvegicus leucine rich repeat containing 48 (Lrrc48), mRNA [NM_001013857]	0,327100642	0,009559209	0,419389152
TC626294	TC626294	Unknown	0,3028089	0,009567282	0,419389152
Fars2	NM_001013139	Rattus norvegicus phenylalanine-tRNA synthetase 2 (mitochondrial) (Fars2), mRNA [NM_001013139]	-0,2284552	0,009721964	0,419389152
LOC289157	XR_005884	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (LOC289157), mRNA [XR_005884]	0,257339294	0,009757028	0,419389152
Sipa1l1	NM_139330	Rattus norvegicus signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (Sipa1l1), mRNA [NM_139330]	0,279388138	0,009801473	0,419389152
RGD1308699	NM_001014032	Rattus norvegicus similar to 1700060H10Rik protein (RGD1308699), mRNA [NM_001014032]	-0,319268464	0,009831982	0,419389152
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,428535465	0,009874158	0,419389152
Pscd1	NM_053910	Rattus norvegicus pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1 (Pscd1), mRNA [NM_053910]	0,339095653	0,009924788	0,419389152
Chmp6_predicted	ENSRNOT00000005379	PREDICTED: Rattus norvegicus chromatin modifying protein 6 (predicted) (Chmp6_predicted), mRNA [XM_237816]	-0,220261489	0,009983515	0,419389152

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,696864058	2,68E-05	0,032996805
Rnf36	NM_001013160	Rattus norvegicus ring finger protein 36 (Rnf36), mRNA [NM_001013160]	0,776933391	3,21E-05	0,032996805
Dynll2	NM_080697	Rattus norvegicus dynein light chain LC8-type 2 (Dynll2), mRNA [NM_080697]	0,619279788	4,02E-05	0,032996805
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,671635592	4,13E-05	0,032996805
Baz2b_predicted	ENSRNOT00000031455	Rattus norvegicus similar to KIAA1476 protein (LOC317627), mRNA [XM_229225]	0,797926342	4,19E-05	0,032996805
Isg20	NM_001008510	Rattus norvegicus interferon stimulated exonuclease 20 (Isg20), mRNA [NM_001008510]	0,809991978	4,22E-05	0,032996805
RGD1305986_predicted	ENSRNOT00000001504	Rattus norvegicus similar to FLJ00052 protein (LOC360819), mRNA [XM_341092]	0,647996947	4,62E-05	0,032996805
Ap4b1_predicted	ENSRNOT00000026382	PREDICTED: Rattus norvegicus adaptor-related protein complex AP-4, beta 1 (predicted) (Ap4b1_predicted), mRNA [XM_227538]	-0,528656998	4,65E-05	0,032996805
Phf17_predicted	ENSRNOT00000018872	AW916114 EST347418 Rat gene index, normalized rat, norvegicus, Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGID122 5' end, mRNA sequence [AW916114]	-0,581003292	5,02E-05	0,032996805
Tyropb	AI102519	EST211808 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMBO71 3' end, mRNA sequence [AI102519]	0,887801676	7,50E-05	0,044330409
Atp1b1	NM_013113	Rattus norvegicus ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide (Atp1b1), mRNA [NM_013113]	-0,579479459	8,31E-05	0,044656243
Slb	NM_053792	Rattus norvegicus selective LIM binding factor, rat homolog (Slb), mRNA [NM_053792]	-0,723966911	9,33E-05	0,045937087
Fbln1_predicted	ENSRNOT00000047234	PREDICTED: Rattus norvegicus fibulin 1 (predicted) (Fbln1_predicted), mRNA [XM_243637]	-0,497174033	0,00012445	0,054959473
AA799762	AA799762	AA799762 EST189259 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAF06 3' end, mRNA sequence [AA799762]	0,636009618	0,00013442	0,054959473
AW434274	AW434274	AW434274 UI-R-BJ0p-afw-c-09-0-UI.s1 UI-R-BJ0p Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BJ0p-afw-c-09-0-UI 3', mRNA sequence [AW434274]	0,531290914	0,000139467	0,054959473
CB547141	CB547141	CB547141 AMGNNUC:URRG1-00060-F9-A urrg1 (14046) Rattus norvegicus cDNA clone urrg1-00060-f9 5', mRNA sequence [CB547141]	0,468254247	0,000163613	0,057016397
Lgals8	NM_053862	Rattus norvegicus lectin, galactoside-binding, soluble 8 (Lgals8), mRNA [NM_053862]	0,724349126	0,000164848	0,057016397
Ivns1abp_predicted	NM_001047085	Rattus norvegicus influenza virus NS1A binding protein (predicted) (Ivns1abp_predicted), mRNA [NM_001047085]	0,539231164	0,000173625	0,057016397
Med19_predicted	ENSRNOT00000008911	PREDICTED: Rattus norvegicus mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 19 homolog (yeast) (predicted) (Med19_predicted), mRNA [XM_230275]	-0,437442141	0,000201726	0,059850292
RT1-T24-1	NM_001008858	Rattus norvegicus histocompatibility 2, T region locus 24 (RT1-T24-1), mRNA [NM_001008858]	-0,40827778	0,000202505	0,059850292
Rfk	NM_001014106	Rattus norvegicus riboflavin kinase (Rfk), mRNA [NM_001014106]	0,619421518	0,00024578	0,068732286
Gzma	NM_153468	Rattus norvegicus granzyme A (Gzma), mRNA [NM_153468]	-0,618781582	0,000275195	0,068732286
Mafk	NM_145673	Rattus norvegicus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian) (Mafk), mRNA [NM_145673]	0,820892473	0,000276799	0,068732286
AW917664	AW917664	AW917664 EST348968 Rat gene index, normalized rat, norvegicus, Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGIEG58 5' end, mRNA sequence [AW917664]	-0,555258844	0,00029356	0,068732286
Cmtm3_predicted	ENSRNOT00000014234	PREDICTED: Rattus norvegicus CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3 (predicted) (Cmtm3_predicted), mRNA [XM_226200]	-0,493650544	0,000299018	0,068732286
Fth1	NM_012848	Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1), mRNA [NM_012848]	0,503169758	0,000302984	0,068732286
Ifit2	NM_001024753	Rattus norvegicus interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (Ifit2), mRNA [NM_001024753]	0,596729406	0,000313952	0,068732286
BI275966	BI275966	BI275966 UI-R-CX0-bxi-e-10-0-UI.s1 UI-R-CX0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CX0-bxi-e-10-0-UI 3', mRNA sequence [BI275966]	0,553471838	0,00032695	0,068942613
RGD1310623	NM_001034011	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2010005013 (RGD1310623), mRNA [NM_001034011]	0,497593375	0,00033824	0,068942613
RGD1562099_predicted	ENSRNOT00000024527	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to putative protein product of HMFN0672 (predicted) (RGD1562099_predicted), mRNA [XM_237949]	-0,540683395	0,000375269	0,071351885
ENSRNOT00000025104	ENSRNOT00000025104	Ras-related protein Rab-6A (Rab-6) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9WVVB1] [ENSRNOT00000025104]	0,365806745	0,000391752	0,071351885
Arrdc3	NM_001007797	Rattus norvegicus arrestin domain containing 3 (Arrdc3), mRNA [NM_001007797]	0,498026411	0,000394922	0,071351885
BF551036	BF551036	BF551036 UI-R-C0-hi-e-08-0-UI.r2 UI-R-C0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C0-hi-e-08-0-UI 5', mRNA sequence [BF551036]	-0,432877583	0,000398344	0,071351885
LOC684534	XM_001070862	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to translocating chain-associating membrane protein 2 (LOC684534), mRNA [XM_001070862]	0,372949304	0,000427513	0,073690807
Serpine2	ENSRNOT00000020919	Glia-derived nexin precursor (GDN) (Protease nexin I) (PN-1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P07092] [ENSRNOT00000020919]	0,505322374	0,000436335	0,073690807
Etf1	NM_001008344	Rattus norvegicus eukaryotic translation termination factor 1 (Etf1), mRNA [NM_001008344]	0,489317016	0,000477532	0,075499332
Gramd1b_predicted	ENSRNOT00000009685	PREDICTED: Rattus norvegicus GRAM domain containing 1B (predicted) (Gramd1b_predicted), mRNA [XM_217113]	0,409461416	0,000492078	0,075499332
RGD1564451_predicted	ENSRNOT00000005774	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Tribbles homolog 2 (predicted) (RGD1564451_predicted), mRNA [XM_233982]	-0,490800091	0,000494556	0,075499332
ENSRNOT00000040235	ENSRNOT00000040235	PREDICTED: Rattus norvegicus RAB5C, member RAS oncogene family (predicted) (Rab5c_predicted), mRNA [XM_213463]	0,425726651	0,000509077	0,075499332
March7	NM_001012087	Rattus norvegicus membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (March7), mRNA [NM_001012087]	0,425545835	0,000513265	0,075499332
Hbp1	NM_013221	Rattus norvegicus high mobility group box transcription factor 1 (Hbp1), mRNA [NM_013221]	0,404599462	0,0005424	0,075499332
RGD1561520_predicted	XM_345159	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Ab2-162 (predicted) (RGD1561520_predicted), mRNA [XM_345159]	0,45868597	0,00055115	0,075499332
BI284904	BI284904	BI284904 UI-R-CX0s-cct-f-06-0-UI.s1 UI-R-CX0s Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CX0s-cct-f-06-0-UI 3', mRNA sequence [BI284904]	0,517684202	0,000559418	0,075499332
Id2	NM_013060	Rattus norvegicus inhibitor of DNA binding 2 (Id2), mRNA [NM_013060]	-0,625555898	0,000561998	0,075499332
Asah1	AF214647	Rattus norvegicus ceramidase mRNA, complete cds [AF214647]	0,386795341	0,000640053	0,081912017
ENSRNOT00000029787	ENSRNOT00000029787	Unknown	0,405757131	0,000645342	0,081912017
BU760453	BU760453	UI-R-FS1-cqi-n-16-0-UI.s1 UI-R-FS1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FS1-cqi-n-16-0-UI 3', mRNA sequence [BU760453]	0,562710076	0,000704015	0,081912017
RGD1305685	NM_001047900	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ13089 (RGD1305685), mRNA [NM_001047900]	-0,445590209	0,000718589	0,081912017
Gnb1	NM_030987	Rattus norvegicus guanine nucleotide binding protein, beta 1 (Gnb1), mRNA [NM_030987]	0,350591944	0,000723876	0,081912017
RGD1566073_predicted	ENSRNOT00000034681	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L29 (P23) (predicted) (RGD1566073_predicted), mRNA [XM_344752]	-0,339124319	0,000725686	0,081912017
Map1lc3a	NM_199500	Rattus norvegicus microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (Map1lc3a), mRNA [NM_199500]	0,365434897	0,000732269	0,081912017
MGC94941	NM_001004233	Rattus norvegicus similar to Mkrn1 protein (MGC94941), mRNA [NM_001004233]	0,362757322	0,000740797	0,081912017
AB097855	AB097855	Rattus norvegicus mRNA, Axomer-5, transported in axons. [AB097855]	3,158742392	0,000750755	0,081912017
ENSRNOT00000005384	ENSRNOT00000005384	Rattus norvegicus similar to dribble CG4258-PA (LOC314830), mRNA [XM_235128]	-0,460895973	0,000754848	0,081912017
AA900854	AA900854	AA900854 UI-R-E0-dk-a-11-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-dk-a-11-0-UI 3' similar to gi [AA900854]	0,447178209	0,000762166	0,081912017
BE116572	BE116572	UI-R-BS1-ayj-g-10-0-UI.s1 UI-R-BS1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BS1-ayj-g-10-0-UI 3', mRNA sequence [BE116572]	-0,36186307	0,000780433	0,082377445
Pde7a	ENSRNOT00000043859	High-affinity cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 7A (EC 3.1.4.17) (Rolipram-insensitive phosphodiesterase type 7) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O08593] [ENSRNOT00000043859]	-0,381383599	0,000803027	0,083275359
RGD1562613_predicted	XR_008169	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to U2 small nuclear ribonucleoprotein B (predicted) (RGD1562613_predicted), mRNA [XR_008169]	-0,493675114	0,000819915	0,083560626
LOC364556	AY325145	Rattus norvegicus Ab1-351 mRNA, complete cds. [AY325145]	-0,35489985	0,000841406	0,084297426
Ptpns1	NM_013016	Rattus norvegicus protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1 (Ptpns1), mRNA [NM_013016]	0,351129205	0,000876925	0,084604406
AI008930	AI008930	AI008930 EST203381 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMBF59 3' end, mRNA sequence [AI008930]	0,338887683	0,000884736	0,084604406
Tox_predicted	XM_342800	PREDICTED: Rattus norvegicus thymocyte selection-associated HMGB box gene (predicted) (Tox_predicted), mRNA [XM_342800]	-0,492175897	0,000932635	0,084604406
Rbbp6	ENSRNOT00000035770	Rbbp6 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB85] [ENSRNOT00000035770]	0,454213425	0,000937701	0,084604406

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
Fgf13	NM_053428	Rattus norvegicus fibroblast growth factor 13 (Fgf13), mRNA [NM_053428]	-0,498301493	0,000944941	0,084604406
Rab31	NM_145094	Rattus norvegicus RAB31, member RAS oncogene family (Rab31), mRNA [NM_145094]	0,352361638	0,000946316	0,084604406
Csnk1d	NM_139060	Rattus norvegicus casein kinase 1, delta (Csnk1d), mRNA [NM_139060]	0,402335016	0,000947361	0,084604406
RGD1311909_predicted	ENSRNOT00000015483	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC312654 (predicted) (RGD1311909_predicted), mRNA [XM_001054467]	0,396733357	0,000958974	0,084604406
ENSRNOT00000013790	ENSRNOT00000013790	Histone H2A type 1-E. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:POC170] [ENSRNOT00000013790]	0,453332579	0,000981482	0,085054707
Basp1	NM_022300	Rattus norvegicus brain abundant, membrane attached signal protein 1 (Basp1), mRNA [NM_022300]	0,41983985	0,001011171	0,085054707
LOC682543	XM_001061959	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC682543), mRNA [XM_001061959]	0,372443665	0,001032105	0,085054707
XM_345039	XM_345039	Rattus norvegicus similar to suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1; suppressor of initiator codon mutations-Yeast homolog related sequence 1 (LOC365473), mRNA [XM_345039]	0,318152951	0,001050751	0,085054707
Al229721	Al229721	Al229721 EST226416 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone REMCL08 3' end, mRNA sequence [Al229721]	-0,90800612	0,001057968	0,085054707
TC593623	TC593623	Unknown	0,496064768	0,001060942	0,085054707
RGD1304572_predicted	ENSRNOT00000004621	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA A630007N06 gene (LOC364983), mRNA [XM_344751]	-0,364230376	0,001064803	0,085054707
Mapk14	NM_031020	Rattus norvegicus mitogen activated protein kinase 14 (Mapk14), mRNA [NM_031020]	0,447524579	0,001101115	0,085269708
V1rm3	NM_001008934	Rattus norvegicus vomeronasal 1 receptor, m3 (V1rm3), mRNA [NM_001008934]	0,449242297	0,001108445	0,085269708
Map2k1ip1	NM_001008375	Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1 (Map2k1ip1), mRNA [NM_001008375]	0,412350372	0,001134087	0,085269708
Hck	NM_013185	Rattus norvegicus hemopoietic cell kinase (Hck), mRNA [NM_013185]	0,33305291	0,001135562	0,085269708
Scye1	NM_053757	Rattus norvegicus small inducible cytokine subfamily E, member 1 (Scye1), mRNA [NM_053757]	-0,31413298	0,001139622	0,085269708
RGD1308734	NM_001013927	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1100001H23 (RGD1308734), mRNA [NM_001013927]	0,456438097	0,001169479	0,085891657
LOC500904	ENSRNOT00000009544	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to neutrophil cytosolic factor 4 (LOC500904), mRNA [XM_576306]	0,518185826	0,001198093	0,085891657
Il13ra1	NM_145789	Rattus norvegicus interleukin 13 receptor, alpha 1 (Il13ra1), mRNA [NM_145789]	0,345792827	0,001214397	0,085891657
Ccnl1	NM_053662	Rattus norvegicus cyclin L1 (Ccnl1), mRNA [NM_053662]	0,322164176	0,00123413	0,085891657
Pja2	NM_138896	Rattus norvegicus praja 2, RING-H2 motif containing (Pja2), mRNA [NM_138896]	0,574289218	0,001235184	0,085891657
Gadd45a	NM_024127	Rattus norvegicus growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45a), mRNA [NM_024127]	0,396985932	0,001264685	0,085891657
Ahdcd1_predicted	XM_342936	PREDICTED: Rattus norvegicus AT hook, DNA binding motif, containing 1 (predicted) (Ahdcd1_predicted), mRNA [XM_342936]	-0,402474347	0,00126627	0,085891657
A_44_P560036	A_44_P560036	Unknown	-0,33975276	0,001274745	0,085891657
DV727231	DV727231	RVL19689 Wackym-Soares normalized rat vestibular cDNA library Rattus norvegicus cDNA 5', mRNA sequence [DV727231]	-0,32077581	0,001278712	0,085891657
Ppap2b	NM_138905	Rattus norvegicus phosphatidic acid phosphatase type 2B (Ppap2b), mRNA [NM_138905]	-0,442623642	0,00131595	0,085937327
Lrrc33	NM_001024995	Rattus norvegicus leucine rich repeat containing 33 (Lrrc33), mRNA [NM_001024995]	-0,395599298	0,0013316	0,085937327
DY470931	DY470931	RVL22088 Wackym-Soares normalized rat vestibular cDNA library Rattus norvegicus cDNA 5', mRNA sequence [DY470931]	-0,590069859	0,001335752	0,085937327
RGD1566224_predicted	ENSRNOT00000008680	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2210416116 (predicted) (RGD1566224_predicted), mRNA [XM_575742]	0,374655539	0,001337546	0,085937327
Rpl31	NM_022506	Rattus norvegicus ribosomal protein L31 (Rpl31), mRNA [NM_022506]	-0,313651802	0,001369376	0,086422555
ENSRNOT000000059328	ENSRNOT000000059328	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC680615), mRNA [XM_001058007]	0,412574329	0,001374339	0,086422555
Ubx2	NM_001012025	Rattus norvegicus UBX domain containing 2 (Ubx2), mRNA [NM_001012025]	0,384609865	0,001394098	0,086742236
LOC684233	XM_001068152	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Putative RNA-binding protein 15 (RNA-binding motif protein 15) (One-twenty two protein) (LOC684233), mRNA [XM_001068152]	-0,324470498	0,001440137	0,086794335
RGD1311300	NM_001030043	Rattus norvegicus similar to T cell receptor V delta 6 (RGD1311300), mRNA [NM_001030043]	-0,399129698	0,001440616	0,086794335
Id2	NM_013060	Rattus norvegicus inhibitor of DNA binding 2 (Id2), mRNA [NM_013060]	-0,449807234	0,001456092	0,086794335
RGD1309779_predicted	ENSRNOT00000011017	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ENSANGP00000021391 (predicted) (RGD1309779_predicted), mRNA [XM_343405]	-0,318765071	0,001466103	0,086794335
Map4k1_predicted	ENSRNOT00000027837	PREDICTED: Rattus norvegicus mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 1 (predicted) (Map4k1_predicted), mRNA [XM_214883]	-0,400146351	0,001490643	0,086794335
Hbp1	NM_013221	Rattus norvegicus high mobility group box transcription factor 1 (Hbp1), mRNA [NM_013221]	0,323130345	0,00152548	0,086794335
Rab21	NM_001004238	Rattus norvegicus RAB21, member RAS oncogene family (Rab21), mRNA [NM_001004238]	0,405840829	0,001526142	0,086794335
Cbl27	BC061751	Rattus norvegicus androgen receptor-related apoptosis-associated protein CBL27, mRNA (cDNA clone IMAGE:5600134), complete cds. [BC061751]	0,307347598	0,001528681	0,086794335
RGD1307393	NM_001014078	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC9907 (RGD1307393), mRNA [NM_001014078]	-0,634859084	0,001537748	0,086794335
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,565183129	0,00154177	0,086794335
Ywahaq	NM_013053	Rattus norvegicus tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, theta polypeptide (Ywahaq), mRNA [NM_013053]	-0,344083836	0,001585512	0,087312427
Serpine2	ENSRNOT00000020919	Glia-derived nexin precursor (GDN) (Protease nexin I) (PN-1). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P07092] [ENSRNOT00000020919]	0,55627264	0,001593575	0,087312427
BF557013	BF557013	BF557013 UI-R-C0-hm-e-03-O-UI.r1 UI-R-C0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C0-hm-e-03-O-UI 5', mRNA sequence [BF557013]	-0,45332733	0,001608693	0,087312427
TC607251	TC607251	Unknown	-0,535554326	0,001610058	0,087312427
Vkorc1l1	NM_203338	Rattus norvegicus vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1 (Vkorc1l1), mRNA [NM_203338]	-0,615258382	0,001630526	0,087413776
A_44_P959674	A_44_P959674	Unknown	0,298043251	0,001642995	0,087413776
Josd2_predicted	ENSRNOT00000026379	PREDICTED: Rattus norvegicus Josephin domain containing 2 (predicted) (Josd2_predicted), mRNA [XM_214929]	0,564995279	0,001664607	0,087413776
CO563830	CO563830	AGENCOURT_28540152 NIH_MGC_249 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7375638 5', mRNA sequence [CO563830]	-0,295392683	0,00168079	0,087413776
Rassf2	NM_001037096	Rattus norvegicus Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 (Rassf2), mRNA [NM_001037096]	0,395894522	0,001685869	0,087413776
Efha1	ENSRNOT00000015233	EF-hand domain-containing family member A1. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q99P63] [ENSRNOT00000015233]	0,392259193	0,001761688	0,089610713
ENSRNOT00000016098	ENSRNOT00000016098	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ubiquitin specific protease 12 (predicted) (RGD1561481_predicted), mRNA [XM_577055]	0,320650716	0,001767216	0,089610713
Zcchc11_predicted	ENSRNOT0000003386	PREDICTED: Rattus norvegicus zinc finger, CCHC domain containing 11 (predicted) (Zcchc11_predicted), mRNA [XM_233345]	-0,313932239	0,001805754	0,089610713
RGD1309973	NM_001012350	Rattus norvegicus hypothetical LOC301634 (RGD1309973), mRNA [NM_001012350]	-0,309716871	0,001808699	0,089610713
A_44_P140233	A_44_P140233	Unknown	-0,382050117	0,001814614	0,089610713
TC598582	TC598582	Q5BI25_DROME (Q5BI25) LD12915p (Fragment), partial (6%) [TC598582]	-0,326081211	0,001819199	0,089610713
Acads	NM_022512	Rattus norvegicus acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain (Acads), mRNA [NM_022512]	2,438112414	0,001848896	0,089867507
CO405333	CO405333	AGENCOURT_26761257 NIH_MGC_255 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7318895 5', mRNA sequence [CO405333]	0,418061093	0,001856639	0,089867507
Cds2	NM_053643	Rattus norvegicus CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2 (Cds2), mRNA [NM_053643]	0,318427016	0,001875483	0,089867507
Aes	NM_019220	Rattus norvegicus amino-terminal enhancer of split (Aes), mRNA [NM_019220]	-0,456251579	0,001914765	0,089867507
ENSRNOT00000045060	ENSRNOT00000045060	similar to ribosomal protein L22 like 1 (LOC365655), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_008735] [ENSRNOT00000015756]	-0,409610056	0,001941468	0,089867507
AA900394	AA900394	UI-R-E0-cm-h-03-O-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-cm-h-03-O-UI 3', mRNA sequence [AA900394]	0,337800498	0,001944712	0,089867507

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
LOC679869	XM_001054844	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box, transcript variant 2 (LOC679869), mRNA [XM_001054844]	0,48306587	0,001982699	0,089867507
RGD1561243_predicted	ENSRNOT00000022583	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to KIAA1052 protein (predicted) (RGD1561243_predicted), mRNA [XM_343383]	-0,365354645	0,001985053	0,089867507
Hspd1	NM_022229	Rattus norvegicus heat shock protein 1 (chaperonin) (Hspd1), mRNA [NM_022229]	-0,475128129	0,002006296	0,089867507
BM390804	BM390804	BM390804 UI-R-CN1-cjo-f-10-0-UI.s1 UI-R-CN1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CN1-cjo-f-10-0-UI 3', mRNA sequence [BM390804]	0,441971916	0,002008896	0,089867507
AI178191	AI178191	AI178191 EST221856 Normalized rat placenta, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RPLCN35 3' end, mRNA sequence [AI178191]	0,413644597	0,002020508	0,089867507
Tceb1	NM_022593	Rattus norvegicus transcription elongation factor B (Sili), polypeptide 1 (Tceb1), mRNA [NM_022593]	0,325374923	0,002026391	0,089867507
Rpl5	NM_031099	Rattus norvegicus ribosomal protein L5 (Rpl5), mRNA [NM_031099]	-0,327917464	0,00204969	0,089867507
RGD1309748_predicted	ENSRNOT00000003439	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to CG4768-PA (predicted) (RGD1309748_predicted), mRNA [XM_220139]	0,296116352	0,002057402	0,089867507
LOC500282	NM_001024332	Rattus norvegicus similar to ADP-ribosylation factor-like 10C (LOC500282), mRNA [NM_001024332]	0,320427377	0,00210753	0,089867507
XM_226639	XM_226639	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein CLONE24945 (LOC309945), mRNA [XM_226639]	0,57068782	0,002113243	0,089867507
AA998488	AA998488	AA998488 UI-R-C0-ie-d-07-0-UI.s1 UI-R-C0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C0-ie-d-07-0-UI 3', mRNA sequence [AA998488]	0,5023151	0,00214615	0,089867507
Xrn2_predicted	ENSRNOT00000016351	PREDICTED: Rattus norvegicus 5'-3' exoribonuclease 2 (predicted) (Xrn2_predicted), mRNA [XM_342535]	-0,3331523	0,002149122	0,089867507
LOC304860	NM_001013984	Rattus norvegicus similar to N-acetylneuraminate pyruvate lyase (LOC304860), mRNA [NM_001013984]	0,442940282	0,002182348	0,089867507
RGD1310484_predicted	ENSRNOT00000027663	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC37079 (predicted) (RGD1310484_predicted), mRNA [XM_214594]	0,470158673	0,002186676	0,089867507
ENSRNOT00000041694	ENSRNOT00000041694	similar to ribosomal protein S27a (predicted) (RGD1560343_predicted), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007321] [ENSRNOT000000041694]	-0,386532248	0,002198549	0,089867507
Hook3	AY310154	Rattus norvegicus Ac1288 mRNA, complete cds. [AY310154]	0,407799764	0,00221348	0,089867507
Prkaa1	NM_019142	Rattus norvegicus protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit (Prkaa1), mRNA [NM_019142]	0,321055842	0,00223846	0,089867507
Cdc42	NM_171994	Rattus norvegicus cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) (Cdc42), mRNA [NM_171994]	0,331891868	0,00229546	0,089867507
ENSRNOT00000021309	ENSRNOT000000021309	Nucleoporin-like protein RIP (HIV-1 Rev-binding protein homolog). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4KLH5] [ENSRNOT000000021309]	0,385823034	0,002250838	0,089867507
Stx11	ENSRNOT00000019983	syntaxin 11 [Source:RefSeq_peptide;Acc:NP_001020809] [ENSRNOT00000019983]	0,45032062	0,002271211	0,089867507
LOC368070	ENSRNOT00000005439	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Pinin (LOC368070), mRNA [XM_347237]	-0,372690517	0,00228028	0,089867507
TC583811	TC583811	Q5XIE0_RAT (Q5XIE0) Acidic (Leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E (Predicted), complete [TC583811]	-0,370080773	0,002293429	0,089867507
Ddx3x	ENSRNOT00000039551	Rattus norvegicus similar to RNA helicase (LOC317335), mRNA [XM_228701]	0,405111176	0,002318853	0,089867507
CA506597	CA506597	UI-R-FJ0-cqc-e-16-0-UI.s1 UI-R-FJ0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FJ0-cqc-e-16-0-UI 3', mRNA sequence [CA506597]	0,280390717	0,002320521	0,089867507
TC587476	TC587476	Q3SZG1_BOVIN (Q3SZG1) ADP-ribosylation factor 1, partial (96%) [TC587476]	-0,394288448	0,002353824	0,089867507
Bcl6_predicted	ENSRNOT00000002522	PREDICTED: Rattus norvegicus B-cell leukemia [XM_221333]	0,367168721	0,002363312	0,089867507
Pxk	NM_182821	Rattus norvegicus PX domain containing serine/threonine kinase (Pxk), mRNA [NM_182821]	0,495372431	0,002374245	0,089867507
Ctsw	NM_001024242	Rattus norvegicus cathepsin W (Ctsw), mRNA [NM_001024242]	-0,469266588	0,002385427	0,089867507
Polb	NM_017141	Rattus norvegicus polymerase (DNA directed), beta (Polb), mRNA [NM_017141]	0,451925403	0,00240104	0,089867507
Mrap_predicted	ENSRNOT00000036027	PREDICTED: Rattus norvegicus melanocortin 2 receptor accessory protein (predicted) (Mrap_predicted), mRNA [XM_213659]	0,997384508	0,002440863	0,089867507
AI231805	AI231805	AI231805 EST228493 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHECO48 3' end, mRNA sequence [AI231805]	0,495839035	0,002455256	0,089867507
LOC297481	ENSRNOT00000013719	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to eukaryotic translation initiation factor 4E member 3 (LOC297481), mRNA [XM_216226]	0,497737301	0,002459422	0,089867507
RGD1562645_predicted	XM_578756	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to IQ motif containing F1 (predicted) (RGD1562645_predicted), mRNA [XM_578756]	0,376071384	0,002460367	0,089867507
Zyg11bl	ENSRNOT00000035002	Zyg11bl protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB87] [ENSRNOT00000035002]	0,323402762	0,002470904	0,089867507
Trim59_predicted	ENSRNOT00000013987	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2310035M22 (LOC365813), mRNA [XM_345221]	-0,398954442	0,002472355	0,089867507
Cnot6l_predicted	ENSRNOT000000002843	PREDICTED: Rattus norvegicus CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like (predicted) (Cnot6l_predicted), mRNA [XM_341191]	0,358118746	0,002477488	0,089867507
A_44_P821972	A_44_P821972	Unknown	-0,285805292	0,002489097	0,089867507
Als2cr13_predicted	ENSRNOT00000031261	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ38771 (LOC363236), mRNA [XM_343576]	0,604814062	0,002493363	0,089867507
Gpr109a	NM_181476	Rattus norvegicus G protein-coupled receptor 109A (Gpr109a), mRNA [NM_181476]	0,403946556	0,002533134	0,090747589
LOC302495	XR_006183	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC302495 (LOC302495), mRNA [XR_006183]	0,540679955	0,002584652	0,091490547
LOC500855	BC083795	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC500855, mRNA (cDNA clone IMAGE:7107458), complete cds. [BC083795]	-0,28126746	0,002590899	0,091490547
Adora3	NM_012896	Rattus norvegicus adenosine A3 receptor (Adora3), mRNA [NM_012896]	0,303572928	0,002600307	0,091490547
Gzmb	X76996	R.norvegicus mRNA for granzyme-like protein III. [X76996]	-0,450057858	0,002645335	0,091713851
Ctsf	NM_001034110	Rattus norvegicus cathepsin F (Ctsf), mRNA [NM_001034110]	0,29496591	0,002653066	0,091713851
Eaf1_predicted	ENSRNOT00000026525	PREDICTED: Rattus norvegicus ELL associated factor 1 (predicted) (Eaf1_predicted), mRNA [XM_224618]	0,630510646	0,002696445	0,091713851
Stat5b	NM_022380	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA [NM_022380]	0,568286416	0,002704659	0,091713851
LOC364669	XR_005958	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein S27a (LOC364669), mRNA [XR_005958]	-0,464541898	0,002744232	0,091713851
Fbxl3	ENSRNOT00000013885	Fbxl3 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q562A1] [ENSRNOT00000013885]	0,346890418	0,002773137	0,091713851
Rap2a	NM_053741	Rattus norvegicus RAS related protein 2a? (Rap2a), mRNA [NM_053741]	0,357130929	0,002774579	0,091713851
ENSRNOT000000055129	ENSRNOT000000055129	Ddx27 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5IOG6] [ENSRNOT000000055129]	-0,29704939	0,002776239	0,091713851
Ptpre	ENSRNOT000000021359	Protein tyrosine phosphatase epsilon (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q9WV21] [ENSRNOT000000021359]	0,393858903	0,002778248	0,091713851
Car1_predicted	ENSRNOT00000014267	PREDICTED: Rattus norvegicus carbonic anhydrase 1 (predicted) (Car1_predicted), mRNA [XM_226922]	0,343831351	0,00281283	0,091713851
LOC297884	XR_006330	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L23a (LOC297884), mRNA [XR_006330]	-0,355465254	0,002815961	0,091713851
RGD1562337_predicted	ENSRNOT000000051158	AY769435 mesoderm induction early response 1 N1 beta [Mus musculus] (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (51%) [TC612555]	0,452118211	0,002828986	0,091713851
Vapa	NM_031631	Rattus norvegicus vesicle-associated membrane protein, associated protein A (Vapa), mRNA [NM_031631]	0,379331292	0,002831539	0,091713851
ENSRNOT00000006835	ENSRNOT00000006835	Cysteine-rich protein 1 (Cysteine-rich intestinal protein) (CRIP). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P63255] [ENSRNOT00000006835]	-0,276893541	0,002851173	0,091713851
Lpxn	NM_001009649	Rattus norvegicus leupaxin (Lpxn), mRNA [NM_001009649]	-0,293006301	0,002870425	0,091713851
Bbs7	NM_001012180	Rattus norvegicus Bardet-Biedl syndrome 7 (Bbs7), mRNA [NM_001012180]	-0,41844165	0,002891992	0,091713851
Pdlim5	NM_053326	Rattus norvegicus PDZ and LIM domain 5 (Pdlim5), mRNA [NM_053326]	0,478661046	0,00293556	0,091713851
Aph1a	NM_001014255	Rattus norvegicus anterior pharynx defective 1a homolog (C. elegans) (Aph1a), mRNA [NM_001014255]	0,288923624	0,002966744	0,091713851
Kns2	M75147	Rat kinesin light chain B mRNA. [M75147]	0,268112769	0,002971073	0,091713851
Id2	NM_013060	Rattus norvegicus inhibitor of DNA binding 2 (Id2), mRNA [NM_013060]	-0,448237803	0,002973795	0,091713851
Emg1_predicted	XM_232345	PREDICTED: Rattus norvegicus EMG1 nucleolar protein homolog (S. cerevisiae) (predicted) (Emg1_predicted), mRNA [XM_232345]	-0,356473045	0,002995556	0,091713851

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
Mkln1	NM_031359	Rattus norvegicus muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs (Mkln1), mRNA [NM_031359]	0,366587539	0,003013342	0,091713851
Cct5	NM_001004078	Rattus norvegicus chaperonin subunit 5 (epsilon) (Cct5), mRNA [NM_001004078]	-0,587929728	0,003019401	0,091713851
Rps20	NM_001007603	Rattus norvegicus ribosomal protein S20 (Rps20), mRNA [NM_001007603]	-0,346306315	0,003021929	0,091713851
Scml4_predicted	ENSRNOT00000039639	PREDICTED: Rattus norvegicus sex comb on midleg-like 4 (Drosophila) (predicted) (Scml4_predicted), mRNA [XM_228308]	-0,762111636	0,003022585	0,091713851
Dyrk2_predicted	XM_235179	PREDICTED: Rattus norvegicus dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (predicted) (Dyrk2_predicted), mRNA [XM_235179]	-0,442940906	0,003035038	0,091713851
BM392140	BM392140	BM392140 UI-R-DO1-ckp-c-12-0-UI.s1 UI-R-DO1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-DO1-ckp-c-12-0-UI 3', mRNA sequence [BM392140]	0,429341724	0,00304757	0,091713851
Rpl22	NM_031104	Rattus norvegicus ribosomal protein L22 (Rpl22), mRNA [NM_031104]	-0,323975979	0,003055826	0,091713851
RGD1565054_predicted	ENSRNOT00000034714	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S acidic ribosomal protein P1 (predicted) (RGD1565054_predicted), mRNA [XM_234147]	-0,272243857	0,003056611	0,091713851
Vamp5	NM_053555	Rattus norvegicus vesicle-associated membrane protein 5 (Vamp5), mRNA [NM_053555]	0,314102404	0,00309403	0,091875586
Mbip_predicted	ENSRNOT00000011419	PREDICTED: Rattus norvegicus MAP3K12 binding inhibitory protein 1 (predicted) (Mbip_predicted), mRNA [XM_343066]	-0,410819471	0,003099502	0,091875586
LOC312502	XR_005948	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RAB11 family interacting protein 5 (class I) isoform 1 (LOC312502), mRNA [XR_005948]	0,873854404	0,003108631	0,091875586
RGD1563192_predicted	XM_225959	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to YTH domain containing 2 (predicted) (RGD1563192_predicted), mRNA [XM_225959]	-0,628680093	0,003155928	0,0928094
Arhgap9_predicted	BC107938	Rattus norvegicus Arhgap9_predicted protein, mRNA (cDNA clone MGC:125000 IMAGE:7378387), complete cds. [BC107938]	0,287452461	0,003196478	0,093536529
NM_219368	XM_219368	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 9130023H24 gene (LOC293521), mRNA [XM_219368]	0,489699554	0,003233388	0,094150523
Max	NM_022210	Rattus norvegicus Max protein (Max), mRNA [NM_022210]	0,684956907	0,003255218	0,094321528
ENSRNOT00000028801	ENSRNOT00000028801	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G like (LOC690254), mRNA [XM_001073863]	-0,370828553	0,003293972	0,094978885
Fmnl1_predicted	ENSRNOT00000004353	PREDICTED: Rattus norvegicus formin-like 1 (predicted) (Fmnl1_predicted), mRNA [XM_213487]	0,434955297	0,003375268	0,096247188
AW141737	AW141737	AW141737 EST291816 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGICE94 5' end similar to unr protein, mRNA sequence [AW141737]	0,400200235	0,003385708	0,096247188
ENSRNOT00000024471	ENSRNOT00000024471	PREDICTED: Rattus norvegicus NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha [XM_215044]	-0,272431036	0,003386807	0,096247188
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,279320308	0,003419356	0,096398014
Elf2	ENSRNOT00000032974	Elf2 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q2NL49] [ENSRNOT00000032974]	0,555890979	0,003460945	0,096398014
ENSRNOT00000043415	ENSRNOT00000043415	PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (predicted) (Cpeb4_predicted), mRNA [XM_220269]	0,433892847	0,003498049	0,096398014
Lcmt2	NM_001011956	Rattus norvegicus leucine carboxyl methyltransferase 2 (Lcmt2), mRNA [NM_001011956]	-0,28967942	0,00350857	0,096398014
RGD1306894_predicted	XM_344763	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 5830457O10 (predicted) (RGD1306894_predicted), mRNA [XM_344763]	0,334696665	0,003517189	0,096398014
DY319575	DY319575	AGENCOURT_66963388 NIH_MGC_366 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:8367984 5', mRNA sequence [DY319575]	-0,554594735	0,003535679	0,096398014
Mapk8ip3	XM_220232	PREDICTED: Rattus norvegicus mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 (Mapk8ip3), mRNA [XM_220232]	0,282909218	0,00353855	0,096398014
Cebpb	NM_024125	Rattus norvegicus CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb), mRNA [NM_024125]	0,399622908	0,003600294	0,096398014
TC625093	TC625093	Unknown	-0,305144024	0,003603307	0,096398014
RGD1561919_predicted	ENSRNOT00000047417	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein S18 (predicted) (RGD1561919_predicted), mRNA [XM_226269]	-0,250517941	0,003614161	0,096398014
LOC305181	XR_006068	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Elongation factor 2 (EF-2) (LOC305181), mRNA [XR_006068]	-0,375282412	0,003633175	0,096398014
Fus	NM_001012137	Rattus norvegicus fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human) (Fus), mRNA [NM_001012137]	-0,312649856	0,00363403	0,096398014
RGD1559566_predicted	ENSRNOT00000042622	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L9 (predicted) (RGD1559566_predicted), mRNA [XM_234521]	-0,280226136	0,003637718	0,096398014
Rpl5	NM_031099	Rattus norvegicus ribosomal protein L5 (Rpl5), mRNA [NM_031099]	-0,286257462	0,003650827	0,096398014
Anxa7	NM_130416	Rattus norvegicus annexin A7 (Anxa7), mRNA [NM_130416]	0,284326081	0,003660857	0,096398014
Ai234663	Ai234663	Ai234663 EST231225 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVCG11 3' end, mRNA sequence [Ai234663]	-0,472561068	0,003672327	0,096398014
March3	NM_001007759	Rattus norvegicus membrane-associated ring finger (C3HC4) 3 (March3), mRNA [NM_001007759]	0,408826302	0,003693323	0,096398014
Ucp2	NM_019354	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA [NM_019354]	0,374800588	0,003708685	0,096398014
AA900371	AA900371	AA900371 UI-R-E0-cm-f-01-0-UI.s2 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-cm-f-01-0-UI 3' similar to gi [AA900371]	0,390335812	0,003714877	0,096398014
Usp32_predicted	ENSRNOT00000036814	Rattus norvegicus similar to ubiquitin specific protease 32; ubiquitin specific protease (LOC303394), mRNA [XM_220798]	0,438892362	0,003718279	0,096398014
AI009501	AI009501	AI009501 EST203952 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEBK88 3' end, mRNA sequence [AI009501]	0,446679314	0,003784964	0,097082797
BF289184	BF289184	BF289184 EST453775 Rat Gene Index, normalized rat, Rattus norvegicus cDNA Rattus norvegicus cDNA clone RGIHC06, mRNA sequence [BF289184]	0,513278534	0,003792703	0,097082797
A_44_P363362	A_44_P363362	Unknown	0,513900828	0,003799818	0,097082797
H2a	NM_021840	Rattus norvegicus histone 2a (H2a), mRNA [NM_021840]	0,400726025	0,003822528	0,097082797
RGD1562952_predicted	ENSRNOT000000061017	Rattus norvegicus similar to erbb2 interacting protein; densin-180-like protein; erbb2-interacting protein (LOC365662), mRNA [XM_345148]	0,404863919	0,003859333	0,097082797
Olr34_predicted	NM_001000689	Rattus norvegicus olfactory receptor 34 (predicted) (Olr34_predicted), mRNA [NM_001000689]	0,415306719	0,003877263	0,097082797
ENSRNOT000000025773	ENSRNOT000000025773	Protein orai-3 (Transmembrane protein 142C). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q6AXR8] [ENSRNOT000000025773]	-0,622028769	0,003882679	0,097082797
LOC316122	NM_212524	Rattus norvegicus CGI-58-like protein (LOC316122), mRNA [NM_212524]	0,446380914	0,003885617	0,097082797
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,253560001	0,00389275	0,097082797
RGD1560612_predicted	AY724487	Rattus norvegicus clone UI-R-FJ0-cpv-f-20-0-UI unknown mRNA [AY724487]	0,361631618	0,003935622	0,097082797
Zfp216_predicted	ENSRNOT000000024583	Rattus norvegicus similar to zinc finger protein ZNF216 (LOC293960), mRNA [XM_215251]	0,259092213	0,003964135	0,097082797
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,697617459	0,003976879	0,097082797
Ssbp1	NM_183328	Rattus norvegicus single-stranded DNA binding protein 1 (Ssbp1), mRNA [NM_183328]	-0,277773451	0,003977494	0,097082797
AI411577	AI411577	AI411577 EST239871 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVET21 3' end, mRNA sequence [AI411577]	0,378468138	0,003978189	0,097082797
Elmo1_predicted	ENSRNOT000000025516	PREDICTED: Rattus norvegicus engulfment and cell motility 1, ced-12 homolog (C. elegans) (predicted) (Elmo1_predicted), mRNA [XM_341532]	0,42286407	0,003991054	0,097082797
RGD1310681_predicted	ENSRNOT000000022249	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 6720467C03 (predicted) (RGD1310681_predicted), mRNA [XM_216357]	-0,318818042	0,004023806	0,097478343
BF391513	BF391513	BF391513 UI-R-CA1-bcx-h-08-0-UI.s1 UI-R-CA1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CA1-bcx-h-08-0-UI 3', mRNA sequence [BF391513]	0,371575895	0,004081329	0,097747467
Ftl1	NM_022500	Rattus norvegicus ferritin light chain 1 (Ftl1), mRNA [NM_022500]	0,427549814	0,004093182	0,097747467
Dirc2	NM_001012017	Rattus norvegicus disrupted in renal carcinoma 2 homolog (human) (Dirc2), mRNA [NM_001012017]	0,286914568	0,004110717	0,097747467
LOC288481	XR_006910	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC288481 (LOC288481), mRNA [XR_006910]	0,29556357	0,004147169	0,097747467
Syncrnp	NM_001047916	Rattus norvegicus synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein (Syncrnp), mRNA [NM_001047916]	-0,299040274	0,004168772	0,097747467
ENSRNOT00000015179	ENSRNOT00000015179	Rattus norvegicus similar to Vinculin (Metavinculin) (LOC305679), mRNA [XM_223781]	-0,368355166	0,004184832	0,097747467
Ccl5	NM_031116	Rattus norvegicus chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5), mRNA [NM_031116]	-0,463932342	0,004213914	0,097747467
Fabp3	NM_024162	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 3 (Fabp3), mRNA [NM_024162]	-0,377276661	0,004214115	0,097747467

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
BG665133	BG665133	BG665133 DRABYH08 Rat DRG Library Rattus norvegicus cDNA clone DRABYH08 5', mRNA sequence [BG665133]	0,391024032	0,00421463	0,097747467
Snx27	NM_152847	Rattus norvegicus sorting nexin family member 27 (Snx27), mRNA [NM_152847]	0,244084947	0,004233924	0,097747467
Phr1_predicted	ENSRNOT00000014583	PREDICTED: Rattus norvegicus pam, highwire, rpm 1 (predicted) (Phr1_predicted), mRNA [XM_214245]	-0,305163551	0,004242485	0,097747467
ENSRNOT00000040062	ENSRNOT00000040062	Atpase, class VI, type 11C (predicted) [Atp11c_predicted], mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007360] [ENSRNOT00000040062]	0,370299753	0,004265855	0,097747467
Alpl	NM_013059	Rattus norvegicus alkaline phosphatase, tissue-nonspecific (Alpl), mRNA [NM_013059]	0,530424566	0,004266412	0,097747467
Bsn	NM_019146	Rattus norvegicus bassoon (Bsn), mRNA [NM_019146]	0,268710463	0,004266426	0,097747467
Tbrg4	NM_001012154	Rattus norvegicus transforming growth factor beta regulated gene 4 (Tbrg4), mRNA [NM_001012154]	-0,258967458	0,004315209	0,098259704
Timp2	NM_021989	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2), mRNA [NM_021989]	0,361570395	0,004322031	0,098259704
Tbl1x_predicted	XM_217623	PREDICTED: Rattus norvegicus transducin (beta)-like 1 X-linked (predicted) (Tbl1x_predicted), mRNA [XM_217623]	0,31808815	0,004402623	0,098394617
RGD1305961_predicted	ENSRNOT00000007701	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein DKFZp566A1524 (predicted) (RGD1305961_predicted), mRNA [XM_216666]	0,325647822	0,004436174	0,098394617
LOC317588	NM_001047895	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC317588 (LOC317588), mRNA [NM_001047895]	-0,45030909	0,004452841	0,098394617
Capn10	NM_031673	Rattus norvegicus calpain 10 (Capn10), mRNA [NM_031673]	0,269145052	0,004459421	0,098394617
Narg1_predicted	ENSRNOT00000017379	BF566146 UI-R-BT1-ajz-e-07-0-UI.r1 UI-R-BT1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BT1-ajz-e-07-0-UI 5', mRNA sequence [BF566146]	-0,347908417	0,004468149	0,098394617
RGD1565459_predicted	ENSRNOT00000042056	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L10a (predicted) (RGD1565459_predicted), mRNA [XM_001081626]	-0,342682097	0,00447176	0,098394617
Mmp2	NM_031054	Rattus norvegicus matrix metalloproteinase 2 (Mmp2), mRNA [NM_031054]	0,271944715	0,004473881	0,098394617
LOC295574	XR_006202	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 40S ribosomal protein S15 (RIG protein) (LOC295574), mRNA [XR_006202]	-0,310903934	0,004473944	0,098394617
A_44_P431577	A_44_P431577	Unknown	0,247005116	0,004477779	0,098394617
Ier5l	NM_001025041	Rattus norvegicus immediate early response 5-like (Ier5l), mRNA [NM_001025041]	0,369817792	0,00451025	0,098492449
Yip4f	NM_001009712	Rattus norvegicus Yip1 domain family, member 4 (Yip4f), mRNA [NM_001009712]	0,36928254	0,004515556	0,098492449
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,835808473	0,004561573	0,099130354
TC582824	TC582824	Q24497_DROME (Q24497) Bkm protein (Fragment), partial (37%) [TC582824]	0,312841845	0,004597262	0,099236616
Ucp2	NM_019354	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA [NM_019354]	0,446475766	0,004600039	0,099236616
Ddit3	NM_024134	Rattus norvegicus DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3), mRNA [NM_024134]	0,505160606	0,004677909	0,100315489
Ssr4	NM_017199	Rattus norvegicus signal sequence receptor 4 (Ssr4), mRNA [NM_017199]	-0,240522745	0,004683992	0,100315489
Sucla2_predicted	ENSRNOT00000023516	PREDICTED: Rattus norvegicus succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit (predicted) (Sucla2_predicted), mRNA [XM_341354]	-0,265113855	0,004703101	0,10036112
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,324484777	0,004748031	0,100432407
A_44_P119594	A_44_P119594	Unknown	0,286803168	0,004756578	0,100432407
RT1-M5	NM_001048045	Rattus norvegicus RT1 class Ib, locus M5 (RT1-M5), mRNA [NM_001048045]	0,267603655	0,004766939	0,100432407
ENSRNOT00000018684	ENSRNOT00000018684	PREDICTED: Rattus norvegicus ring finger protein 149 (Rnf149), mRNA [XM_343561]	0,289003881	0,004778902	0,100432407
Matr3	NM_019149	Rattus norvegicus matrin 3 (Matr3), mRNA [NM_019149]	-0,379195263	0,004791396	0,100432407
RGD1560821_predicted	XM_346332	Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L24 (LOC367865), mRNA [XM_346332]	-0,344405009	0,004823632	0,100750851
Rnf10	NM_001011904	Rattus norvegicus ring finger protein 10 (Rnf10), mRNA [NM_001011904]	0,309474158	0,00484193	0,100776939
AI411388	AI411388	AI411388 EST239682 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIE564 3' end, mRNA sequence [AI411388]	0,371833871	0,004869839	0,101002178
A_44_P340040	A_44_P340040	Unknown	0,245253872	0,004938199	0,102022962
RGD1308877_predicted	ENSRNOT00000028893	similar to CGI-09 protein (LOC365444), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_005933] [ENSRNOT00000028893]	-0,342257489	0,004965061	0,102022962
RGD1561474_predicted	ENSRNOT00000029993	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to oxyterol-binding protein-like protein 8 isoform a (predicted) (RGD1561474_predicted), mRNA [XM_243478]	0,540576575	0,004970836	0,102022962
Srpk3	NM_184045	Rattus norvegicus serine/arginine-rich protein specific kinase 3 (Srpk3), mRNA [NM_184045]	-0,416337967	0,005011597	0,102283747
Anxa7	NM_130416	Rattus norvegicus annexin A7 (Anxa7), mRNA [NM_130416]	0,254735621	0,005033545	0,102283747
ENSRNOT00000004513	ENSRNOT00000004513	similar to HBxAg transactivated protein 2 (LOC691387), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007088] [ENSRNOT00000004513]	-0,274443843	0,005035454	0,102283747
Tbc1d20	NM_001004281	Rattus norvegicus TBC1 domain family, member 20 (Tbc1d20), mRNA [NM_001004281]	0,346647413	0,005060578	0,102433764
A_44_P489852	A_44_P489852	Unknown	-0,347359556	0,005089725	0,102433764
Rplp2	NM_001030021	Rattus norvegicus ribosomal protein, large P2 (Rplp2), mRNA [NM_001030021]	-0,272695905	0,005108377	0,102433764
CB546113	CB546113	CB546113 AMGNNUC:NRDGI-00144-F5-A nrdg1 (10855) Rattus norvegicus cDNA clone nrdg1-00144-f5 5', mRNA sequence [CB546113]	0,292594477	0,005112157	0,102433764
RGD1309586_predicted	ENSRNOT00000003378	Rattus norvegicus similar to probable ATP-dependent RNA helicase - mouse (LOC364073), mRNA [XM_344187]	0,452094494	0,005176047	0,10363564
Ascc3l1	BC099211	Rattus norvegicus activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1, mRNA (cDNA clone IMAGE:7384540), complete cds. [BC099211]	-0,244975464	0,005220336	0,10354751
Tik2_predicted	ENSRNOT00000008482	Tik2_predicted protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5RJQ5] [ENSRNOT00000008482]	0,293991838	0,005231506	0,10354751
Eef1b2_predicted	ENSRNOT00000034740	similar to eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 (LOC365574), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007592] [ENSRNOT00000034740]	-0,320573036	0,005237812	0,10354751
Spnb2	NM_001013130	Rattus norvegicus spectrin beta 2 (Spnb2), mRNA [NM_001013130]	-0,25621052	0,005273321	0,103756924
ENSRNOT00000005711	ENSRNOT00000005711	similar to 60S ribosomal protein L7 (LOC299934), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_006686] [ENSRNOT00000005711]	-0,266600113	0,005299123	0,103756924
Ppm1g	NM_147209	Rattus norvegicus protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform (Ppm1g), mRNA [NM_147209]	-0,286067073	0,005307995	0,103756924
CV081073	CV081073	AGENCOURT_31478857 NIH_MGC_251 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7386134 5', mRNA sequence [CV081073]	-0,327197782	0,005318618	0,103756924
CX570601	CX570601	RV11770 Wackym-Soares normalized rat vestibular cDNA library Rattus norvegicus cDNA 5', mRNA sequence [CX570601]	-0,339118605	0,005354779	0,104101478
Map1lc3b	NM_022867	Rattus norvegicus microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (Map1lc3b), mRNA [NM_022867]	0,533368184	0,005371502	0,104101478
Cdc42	NM_171994	Rattus norvegicus cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) (Cdc42), mRNA [NM_171994]	0,299987529	0,005412981	0,104300717
AI045489	AI045489	AI045489 UI-R-C1-kj-c-09-0-UI.s1 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C1-kj-c-09-0-UI 3', mRNA sequence [AI045489]	-0,380118656	0,005425545	0,104300717
LOC689314	XM_001073721	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to mitogen-activated protein kinase 11, transcript variant 2 (LOC689314), mRNA [XM_001073721]	-0,362938707	0,005434718	0,104300717
A_44_P530075	A_44_P530075	Unknown	-0,310678454	0,005458554	0,104419134
Cd3z	NM_170789	Rattus norvegicus CD3 antigen, zeta polypeptide (Cd3z), mRNA [NM_170789]	-0,585532751	0,005484282	0,104572869
Pcmt1	NM_013073	Rattus norvegicus protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1 (Pcmt1), mRNA [NM_013073]	0,406456041	0,005553832	0,105093874
Fkbp5	NM_001012174	Rattus norvegicus FK506 binding protein 5 (Fkbp5), mRNA [NM_001012174]	-0,375877107	0,005562596	0,105093874
AF452728	AF452728	Rattus norvegicus synaptogenesis-related mRNA sequence 7, 3' untranslated region. [AF452728]	0,30472065	0,005564944	0,105093874
CR463492	CR463492	CR463492 Rat pBluescript Lion Rattus norvegicus cDNA clone LIONp463C05360 3', mRNA sequence [CR463492]	-0,326532569	0,005591828	0,105265265
ENSRNOT00000046191	ENSRNOT00000046191	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC306962), mRNA [XM_225372]	0,453842826	0,005683158	0,105659271

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,533936553	0,005684581	0,105659271
XM_221736	XM_221736	Rattus norvegicus similar to Set alpha isoform (LOC288330), mRNA [XM_221736]	0,263503824	0,005706517	0,105659271
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,296933743	0,005728406	0,105659271
RGD1563636_predicted	ENSRNOT00000050041	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 40S ribosomal protein S20 (predicted) (RGD1563636_predicted), mRNA [XM_218063]	-0,256458462	0,005728817	0,105659271
ENSRNOT00000038779	ENSRNOT00000038779	hypothetical LOC363906 (LOC363906), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_009172] [ENSRNOT00000038779]	0,259846062	0,005733403	0,105659271
TC580490	TC580490	Q25LS4_MACFA (Q25LS4) Brain cDNA, clone: QccE-20518, partial (72%) [TC580490]	-0,280484376	0,005737883	0,105659271
Vasp_predicted	ENSRNOT00000022214	PREDICTED: Rattus norvegicus vasodilator-stimulated phosphoprotein (predicted) (Vasp_predicted), mRNA [XM_341799]	0,30188043	0,005772971	0,105860684
A_44_P898713	A_44_P898713	Unknown	-0,372490623	0,005807955	0,105860684
RGD1309054_predicted	ENSRNOT00000046155	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to FKSG26 protein (predicted) (RGD1309054_predicted), mRNA [XM_214707]	-0,459571848	0,005831639	0,105860684
Usf1	NM_031777	Rattus norvegicus upstream transcription factor 1 (Usf1), mRNA [NM_031777]	0,327016133	0,005867186	0,105860684
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,250204081	0,005874894	0,105860684
Tspan14_predicted	ENSRNOT00000014772	PREDICTED: Rattus norvegicus tetraspanin 14 (predicted) (Tspan14_predicted), mRNA [XM_224699]	0,318567777	0,005889123	0,105860684
Rab8a	NM_053998	Rattus norvegicus RAB8A, member RAS oncogene family (Rab8a), mRNA [NM_053998]	0,380615522	0,005898173	0,105860684
NM_228776	XM_228776	Rattus norvegicus similar to pigpen (LOC317385), mRNA [XM_228776]	-0,276526871	0,005906229	0,105860684
LOC679126	XM_001054498	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to SMAD-interacting zinc finger protein 2, transcript variant 3 (LOC679126), mRNA [XM_001054498]	0,425107219	0,005910003	0,105860684
Smarca3_predicted	ENSRNOT00000000095	Rattus norvegicus similar to transcription factor (LOC295568), mRNA [XM_215728]	-0,484149166	0,005955436	0,106352204
Igf1	NM_178866	Rattus norvegicus insulin-like growth factor 1 (Igf1), mRNA [NM_178866]	0,441025358	0,006005003	0,106532508
Tcfdp2_predicted	ENSRNOT00000015015	PREDICTED: Rattus norvegicus transcription factor Dp 2 (predicted) (Tcfdp2_predicted), mRNA [XM_217232]	-0,433845898	0,00600948	0,106532508
Unr	NM_054006	Rattus norvegicus upstream of NRAS (Unr), mRNA [NM_054006]	0,422861277	0,0060196	0,106532508
XM_237103	XM_237103	Rattus norvegicus similar to basic, immunoglobulin-like variable motif containing (LOC316371), mRNA [XM_237103]	-0,334410763	0,006044369	0,106651543
AW143596	AW143596	AW143596 EST293801 Normalized rat embryo, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBT23 5' end, mRNA sequence [AW143596]	0,464118448	0,006114181	0,107290152
Olr384_predicted	NM_001000263	Rattus norvegicus olfactory receptor 384 (predicted) (Olr384_predicted), mRNA [NM_001000263]	0,329500419	0,006116864	0,107290152
Tdrd7	NM_138871	Rattus norvegicus tudor domain containing 7 (Tdrd7), mRNA [NM_138871]	0,415649983	0,00617317	0,107293598
AW916189	AW916189	AW916189 EST347493 Rat gene index, normalized rat, norvegicus, Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGIDJ20 5' end, mRNA sequence [AW916189]	-0,360617968	0,006175312	0,107293598
Rpl21	NM_053330	Rattus norvegicus ribosomal protein L21 (Rpl21), mRNA [NM_053330]	-0,288298629	0,00621269	0,107293598
ENSRNOT00000038950	ENSRNOT00000038950	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Solute carrier family 23, member 2 (Sodium-dependent vitamin C transporter 2) (predicted) (RGD1565367_predicted), mRNA [XM_001067886]	0,347484402	0,006218578	0,107293598
Dgat2	NM_001012345	Rattus norvegicus diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse) (Dgat2), mRNA [NM_001012345]	0,42349347	0,006240513	0,107293598
RGD1563958_predicted	ENSRNOT00000004860	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L32 (predicted) (RGD1563958_predicted), mRNA [XM_236007]	-0,299967346	0,00625405	0,107293598
Rps5	ENSRNOT00000026528	40S ribosomal protein S5, [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P24050] [ENSRNOT00000026528]	-0,25744902	0,0062566	0,107293598
Gtf3b_predicted	ENSRNOT00000007490	PREDICTED: Rattus norvegicus gene trap locus F3b (predicted) (Gtf3b_predicted), mRNA [XM_343907]	0,342720727	0,006283898	0,107293598
Daxx	NM_080891	Rattus norvegicus Fas death domain-associated protein (Daxx), mRNA [NM_080891]	-0,273652436	0,006285188	0,107293598
Glimn	ENSRNOT000000002811	PREDICTED: Rattus norvegicus FKBP-associated protein (Glimn), mRNA [XM_213992]	-0,603179818	0,006298575	0,107293598
Nr2c2	NM_017323	Rattus norvegicus nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2 (Nr2c2), mRNA [NM_017323]	0,24912369	0,006359215	0,107717586
Mb	NM_021588	Rattus norvegicus myoglobin (Mb), mRNA [NM_021588]	0,30726449	0,006359912	0,107717586
Olr132_predicted	NM_001001273	Rattus norvegicus olfactory receptor 132 (predicted) (Olr132_predicted), mRNA [NM_001001273]	0,834066394	0,006396587	0,108029212
Wdr61	NM_001025743	Rattus norvegicus WD repeat domain 61 (Wdr61), mRNA [NM_001025743]	-0,243026309	0,006439603	0,108445849
RGD1311324	NM_001014195	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ20254 (RGD1311324), mRNA [NM_001014195]	0,248983459	0,006472435	0,1086891
Rbbp6	ENSRNOT00000035770	Rbbp6 protein (Fragment), [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB85] [ENSRNOT00000035770]	0,284730129	0,006508061	0,108977765
RGD1563478_predicted	XR_008667	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RNA polymerase II transcriptional coactivator (predicted) (RGD1563478_predicted), mRNA [XR_008667]	-0,470558289	0,006558413	0,109510668
A_44_P713802	A_44_P713802	Unknown	-0,242832532	0,006587213	0,109681737
Yipf4	NM_001009712	Rattus norvegicus Yip1 domain family, member 4 (Yipf4), mRNA [NM_001009712]	0,366801091	0,006636673	0,110010135
CV102701	CV102701	AGENCOURT_31523961 NIH_MGC_270 Rattus norvegicus cDNA clone IMAGE:7446235 5', mRNA sequence [CV102701]	-0,285819239	0,006644158	0,110010135
RGD1565713_predicted	ENSRNOT00000048255	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L21 (predicted) (RGD1565713_predicted), mRNA [XM_224201]	-0,23917296	0,006727507	0,110193501
Xrcc1	NM_053435	Rattus norvegicus X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (Xrcc1), mRNA [NM_053435]	-0,576325527	0,006744354	0,110193501
RGD1562402_predicted	ENSRNOT00000045301	60S ribosomal protein L27a, [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P18445] [ENSRNOT00000019247]	0,42976734	0,006746334	0,110193501
C1qb	NM_019262	Rattus norvegicus complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide (C1qb), mRNA [NM_019262]	0,479086333	0,006790904	0,110193501
Mageh1	NM_001013250	Rattus norvegicus melanoma antigen, family H, 1 (Mageh1), mRNA [NM_001013250]	-0,290544132	0,006795192	0,110193501
ENSRNOT00000041929	ENSRNOT00000041929	Histone H2A type 3, [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4FZT6] [ENSRNOT00000041929]	0,445310598	0,00679604	0,110193501
Ipo13	NM_053778	Rattus norvegicus importin 13 (Ipo13), mRNA [NM_053778]	-0,322667352	0,006803996	0,110193501
ENSRNOT00000043942	ENSRNOT00000043942	hypothetical protein LOC682204 (LOC682204), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007832] [ENSRNOT00000043942]	-0,251167257	0,006804369	0,110193501
TC610465	TC610465	Unknown	0,359053424	0,00683227	0,110343019
NM_224065	XM_224065	Rattus norvegicus similar to TCRVA8 (LOC290110), mRNA [XM_224065]	0,325734341	0,006868722	0,11062947
Lrrc48	NM_001013857	Rattus norvegicus leucine rich repeat containing 48 (Lrrc48), mRNA [NM_001013857]	0,351088598	0,006894981	0,110750626
Igf1bp1	NM_013144	Rattus norvegicus insulin-like growth factor binding protein 1 (Igf1bp1), mRNA [NM_013144]	0,248619557	0,006934469	0,110868988
Chd1_predicted	XM_001056703	PREDICTED: Rattus norvegicus chromodomain helicase DNA binding protein 1 (predicted) (Chd1_predicted), mRNA [XM_001056703]	0,26997337	0,006972004	0,110868988
ENSRNOT00000043501	ENSRNOT00000043501	similar to OTTMUSP00000000438 (predicted) (RGD1560032_predicted), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_007408] [ENSRNOT00000043501]	-0,234189498	0,006982505	0,110868988
BF566546	BF566546	BF566546 UI-R-BOO-agn-h-04-O-UI.r1 UI-R-BOO Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BOO-agn-h-04-O-UI 5', mRNA sequence [BF566546]	-0,283193627	0,006986885	0,110868988
MGC124888	NM_001033891	Rattus norvegicus similar to M04b8 protein (MGC124888), mRNA [NM_001033891]	0,362838511	0,006996131	0,110868988
Tbc1d14	NM_001012152	Rattus norvegicus TBC1 domain family, member 14 (Tbc1d14), transcript variant 1, mRNA [NM_001012152]	0,6003256	0,007037926	0,111114939
RGD1565579_predicted	NM_346330	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to tubulin, alpha 1 (predicted) (RGD1565579_predicted), mRNA [XM_346330]	-0,279089276	0,00709442	0,111114939
LOC689621	AA850930	EST193698 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVAO54 3' end, mRNA sequence [AA850930]	0,412456271	0,007096179	0,111114939
Tmsb10	NM_021261	Rattus norvegicus thymosin, beta 10 (Tmsb10), mRNA [NM_021261]	-0,250212526	0,007097757	0,111114939
MGC72957	NM_212510	Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L18a (MGC72957), mRNA [NM_212510]	-0,328235078	0,007176743	0,111114939

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
Lasp1	NM_032613	Rattus norvegicus LIM and SH3 protein 1 (Lasp1), mRNA [NM_032613]	0,291348142	0,007232088	0,111114939
Mcts1	NM_001044237	Rattus norvegicus malignant T cell amplified sequence 1 (Mcts1), mRNA [NM_001044237]	-0,270008342	0,007235001	0,111114939
Lamp2	NM_017068	Rattus norvegicus lysosomal membrane glycoprotein 2 (Lamp2), mRNA [NM_017068]	0,260851449	0,007239947	0,111114939
LOC365309	XR_005845	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L23a (LOC365309), mRNA [XR_005845]	-0,250611545	0,007291706	0,111114939
Rpl31	NM_022506	Rattus norvegicus ribosomal protein L31 (Rpl31), mRNA [NM_022506]	-0,275477463	0,007318535	0,111114939
ENSRNOT0000009755	ENSRNOT0000009755	PREDICTED: Rattus norvegicus THO complex 2 (predicted) (Thoc2_predicted), mRNA [XM_233081]	-0,230646102	0,007333055	0,111114939
Ndfip1	NM_001013059	Rattus norvegicus Nedd4 family interacting protein 1 (Ndfip1), mRNA [NM_001013059]	0,232049339	0,007336047	0,111114939
Ablim1_predicted	NM_001044394	Rattus norvegicus actin-binding LIM protein 1 (predicted) (Ablim1_predicted), mRNA [NM_001044394]	-0,339452965	0,007341405	0,111114939
Bzw1	NM_198789	Rattus norvegicus basic leucine zipper and W2 domains 1 (Bzw1), mRNA [NM_198789]	0,239123567	0,00736015	0,111114939
Arg2	NM_019168	Rattus norvegicus arginase 2 (Arg2), mRNA [NM_019168]	0,466232971	0,007370841	0,111114939
LOC366928	XR_006590	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 40S ribosomal protein S16 (LOC366928), mRNA [XR_006590]	-0,233921077	0,007378132	0,111114939
Ykt6	NM_031692	Rattus norvegicus prenylated SNARE protein (Ykt6), mRNA [NM_031692]	0,259512577	0,007379867	0,111114939
Pdk1	NM_053826	Rattus norvegicus pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1 (Pdk1), mRNA [NM_053826]	0,507286252	0,007389055	0,111114939
ENSRNOT00000036737	ENSRNOT00000036737	Unknown	-0,368632492	0,007390921	0,111114939
BF558098	BF558098	BF558098 UI-R-C0-hk-f-10-0-UI.r1 UI-R-C0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C0-hk-f-10-0-UI 5', mRNA sequence [BF558098]	-0,257867932	0,007398635	0,111114939
DV726678	DV726678	RVL19033 Wackym-Soares normalized rat vestibular cDNA library Rattus norvegicus cDNA 5', mRNA sequence [DV726678]	0,23849424	0,007445918	0,111114939
Gk-rs2	NM_001004077	Rattus norvegicus glucokinase activity, related sequence 2 (Gk-rs2), mRNA [NM_001004077]	0,301597269	0,007452135	0,111114939
RGD1566408_predicted	ENSRNOT00000020641	similar to lin-28 homolog (LOC503116), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_006754] [ENSRNOT00000020641]	0,354234711	0,007482775	0,111114939
Cnksr3	NM_001012061	Rattus norvegicus Cnksr family member 3 (Cnksr3), mRNA [NM_001012061]	0,416571966	0,007492221	0,111114939
BF542992	BF542992	BF542992 UI-R-Y0-abl-e-11-0-UI.r1 UI-R-Y0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-Y0-abl-e-11-0-UI 5', mRNA sequence [BF542992]	0,286582234	0,00750542	0,111114939
Gnb1	NM_030987	Rattus norvegicus guanine nucleotide binding protein, beta 1 (Gnb1), mRNA [NM_030987]	-0,296341114	0,007506091	0,111114939
BF390882	BF390882	BF390882 UI-R-CA1-bci-e-11-0-UI.s1 UI-R-CA1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CA1-bci-e-11-0-UI 3', mRNA sequence [BF390882]	0,457846071	0,007535666	0,111114939
Rtn1	NM_053865	Rattus norvegicus reticulon 1 (Rtn1), mRNA [NM_053865]	0,385656743	0,007575168	0,111114939
Junb	NM_021836	Rattus norvegicus Jun-B oncogene (Junb), mRNA [NM_021836]	0,382039771	0,007575499	0,111114939
Aqp5	NM_012779	Rattus norvegicus aquaporin 5 (Aqp5), mRNA [NM_012779]	-0,36453276	0,00758316	0,111114939
AI411122	AI411122	AI411122 EST239416 Normalized rat kidney, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RKIET69 3' end, mRNA sequence [AI411122]	0,497116469	0,007605472	0,111114939
ENSRNOT00000029576	ENSRNOT00000029576	Grave disease carrier protein (GDC) (Mitochondrial solute carrier protein homolog) (Solute carrier family 25 member 16) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P16261] [ENSRNOT00000029576]	-0,541175728	0,007613187	0,111114939
Tcfcp2l2	NM_001037354	Rattus norvegicus transcription factor CP2-like 2 (Tcfcp2l2), mRNA [NM_001037354]	0,467974799	0,007686616	0,111253598
ENSRNOT00000037483	ENSRNOT00000037483	PREDICTED: Rattus norvegicus pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2 (predicted) (Plekfhf2_predicted), mRNA [XM_342803]	0,281453202	0,007701083	0,111253598
Pglyrp1	NM_053373	Rattus norvegicus peptidoglycan recognition protein 1 (Pglyrp1), mRNA [NM_053373]	0,480101788	0,007723231	0,111253598
Snrpd1_predicted	ENSRNOT00000018646	PREDICTED: Rattus norvegicus small nuclear ribonucleoprotein D1 (predicted) (Snrpd1_predicted), mRNA [XM_214621]	-0,276908718	0,007784615	0,111253598
AI231805	AI231805	AI231805 EST228493 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHECO48 3' end, mRNA sequence [AI231805]	0,433981998	0,007806599	0,111253598
Cryge	NM_173289	Rattus norvegicus crystallin, gamma E (Cryge), mRNA [NM_173289]	0,356431155	0,007814148	0,111253598
Ucp2	NM_019354	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA [NM_019354]	0,339688675	0,007847455	0,111253598
Zfp653_predicted	ENSRNOT00000018874	PREDICTED: Rattus norvegicus zinc finger protein 653 (predicted), transcript variant 2 (Zfp653_predicted), mRNA [XM_001074209]	-0,298202145	0,007851599	0,111253598
ENSRNOT000000049285	ENSRNOT000000049285	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Nedd4 binding protein 1 (predicted) (RGD1305179_predicted), mRNA [XM_214648]	0,432086222	0,007854074	0,111253598
Rab11a	NM_031152	Rattus norvegicus RAB11a, member RAS oncogene family (Rab11a), mRNA [NM_031152]	0,253984153	0,007878927	0,111253598
Dnajc2	NM_053776	Rattus norvegicus DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2 (Dnajc2), mRNA [NM_053776]	-0,275313795	0,007911484	0,111253598
Anxa3	NM_012823	Rattus norvegicus annexin A3 (Anxa3), mRNA [NM_012823]	-0,452112305	0,007915136	0,111253598
TC598091	TC598091	Unknown	-0,307210236	0,00793563	0,111253598
RGD1563123_predicted	ENSRNOT00000003690	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to SEC14-like 1 (predicted) (RGD1563123_predicted), mRNA [XM_340943]	0,225223081	0,00793836	0,111253598
Mdh1	NM_033235	Rattus norvegicus malate dehydrogenase 1, NAD (soluble) (Mdh1), mRNA [NM_033235]	-0,217486302	0,007940429	0,111253598
LOC303810	XR_005604	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L15 (LOC303810), mRNA [XR_005604]	-0,372872839	0,007974037	0,111253598
Prpf3_predicted	ENSRNOT000000035455	PREDICTED: Rattus norvegicus PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast) (predicted) (Prpf3_predicted), mRNA [XM_342295]	-0,249908934	0,007995007	0,111253598
RGD1564581_predicted	XR_007502	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to High mobility group protein 1 (HMG-1) (predicted) (RGD1564581_predicted), mRNA [XR_007502]	0,330800993	0,008030983	0,111253598
G1p2_predicted	ENSRNOT00000039263	PREDICTED: Rattus norvegicus interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (predicted) (G1p2_predicted), mRNA [XM_216605]	0,951010067	0,008079347	0,111253598
RGD1306195	NM_001014062	Rattus norvegicus similar to RAN protein (RGD1306195), mRNA [NM_001014062]	-0,260169572	0,008095633	0,111253598
March5_predicted	ENSRNOT00000023562	PREDICTED: Rattus norvegicus membrane-associated ring finger (C3HC4) 5 (predicted) (March5_predicted), mRNA [XM_215286]	0,247686273	0,008111296	0,111253598
Vapa	NM_031631	Rattus norvegicus vesicle-associated membrane protein, associated protein a (Vapa), mRNA [NM_031631]	0,301777688	0,008115832	0,111253598
Tpd52_predicted	XM_215524	PREDICTED: Rattus norvegicus tumor protein D52 (predicted) (Tpd52_predicted), mRNA [XM_215524]	0,325832682	0,008123575	0,111253598
LOC595134	NM_001030054	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC595134 (LOC595134), mRNA [NM_001030054]	0,294841142	0,008126429	0,111253598
Rac1	NM_134366	Rattus norvegicus ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), mRNA [NM_134366]	0,228299132	0,008134443	0,111253598
Tomm70a	NM_212519	Rattus norvegicus translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (yeast) (Tomm70a), mRNA [NM_212519]	-0,281472561	0,008145878	0,111253598
COX2	ENSRNOT00000043693	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1) (Cytochrome c oxidase polypeptide II). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P00406] [ENSRNOT00000043693]	-0,239686776	0,00815435	0,111253598
BF403483	BF403483	BF403483 UI-R-CA1-biz-d-10-0-UI.s1 UI-R-CA1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CA1-biz-d-10-0-UI 3', mRNA sequence [BF403483]	0,629238154	0,008175554	0,111253598
RGD1311474	NM_001010945	Rattus norvegicus similar to transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha (RGD1311474), mRNA [NM_001010945]	0,284699296	0,008180806	0,111253598
ENSRNOT00000042531	ENSRNOT00000042531	LRRGT00025. [Source:Uniprot/SPTRMBL;Acc:Q6TXH4] [ENSRNOT00000042531]	-0,227964607	0,008187331	0,111253598
Btdb5_predicted	ENSRNOT00000005821	PREDICTED: Rattus norvegicus BTB (POZ) domain containing 5 (predicted) (Btdb5_predicted), mRNA [XM_234235]	-0,326505282	0,008219378	0,111432897
TC593539	TC593539	NM_001027683 Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-83) (Caenorhabditis elegans) (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (5%) [TC593539]	0,64747739	0,008299911	0,112267214
Pank3_predicted	ENSRNOT00000010150	Rattus norvegicus similar to pantothenate kinase 3 (LOC360511), mRNA [XM_340785]	0,385128238	0,008358724	0,112728182
RGD1311077_predicted	ENSRNOT00000010768	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2810485I05 (LOC367021), mRNA [XM_345897]	0,288535488	0,008412352	0,112728182
Eif3s6ip	NM_001034134	Rattus norvegicus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 interacting protein (Eif3s6ip), mRNA [NM_001034134]	-0,237376224	0,008415963	0,112728182
Tegt	BC058478	Rattus norvegicus testis enhanced gene transcript, mRNA (cDNA clone MGC:72852 IMAGE:6888036), complete cds. [BC058478]	0,337546701	0,008445573	0,112728182

Q2 : liste de 494 spots déclarés différentiellement exprimés

(en rouge les 3 spots identifiés également chez les contrôles)

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
RGD1562808_predicted	ENSRNOT00000006851	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ribosomal protein L31 (predicted) (RGD1562808_predicted), mRNA [XM_227719]	-0,368129078	0,008462662	0,112728182
Dncll2	NM_031026	Rattus norvegicus dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2 (Dncll2), mRNA [NM_031026]	-0,299066681	0,008467949	0,112728182
Lyn	NM_030857	Rattus norvegicus Yamaguchi sarcoma viral (v-yes-1) oncogene homolog (Lyn), mRNA [NM_030857]	0,314956894	0,008515891	0,112728182
LOC287533	NM_001013859	Rattus norvegicus similar to putative phosphoinositide 5-phosphatase type II; C62 (LOC287533), mRNA [NM_001013859]	0,378371164	0,008531195	0,112728182
RGD1564541_predicted	ENSRNOT00000016993	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ22965 (predicted) (RGD1564541_predicted), mRNA [XM_233309]	0,322240517	0,008534168	0,112728182
Nap1l1	NM_053561	Rattus norvegicus nucleosome assembly protein 1-like 1 (Nap1l1), mRNA [NM_053561]	-0,363641052	0,008541946	0,112728182
RGD1564600_predicted	ENSRNOT00000007596	BG670494 DRNBH04 Rat DRG Library Rattus norvegicus cDNA clone DRNBH04 5', mRNA sequence [BG670494]	0,23891346	0,00854377	0,112728182
A_44_P462018	A_44_P462018	Unknown	0,320892043	0,008589005	0,113002218
ENSRNOT00000007144	ENSRNOT00000007144	K-CI cotransporter KCC3b isoform (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q6T7Y4] [ENSRNOT00000007144]	0,53555163	0,008605879	0,113002218
Klhl20_predicted	ENSRNOT00000003851	PREDICTED: Rattus norvegicus kelch-like 20 (Drosophila) (predicted) (Klhl20_predicted), mRNA [XM_222806]	-0,264561157	0,008631517	0,113002218
Hmgb2	BC089854	Rattus norvegicus high mobility group box 2, mRNA (cDNA clone MGC:108899 IMAGE:7380208), complete cds. [BC089854]	0,369760869	0,008641009	0,113002218
Pafah1b3	NM_053654	Rattus norvegicus platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha1 subunit (Pafah1b3), mRNA [NM_053654]	-0,242584601	0,008707868	0,113374753
CF109168	CF109168	Shultzomica02419 Rat lung airway and parenchyma cDNA libraries Rattus norvegicus cDNA clone Contig2075 5', mRNA sequence [CF109168]	-0,427424277	0,008757945	0,113374753
ENSRNOT000000051510	ENSRNOT000000051510	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L23a (LOC679137), mRNA [XM_001055330]	-0,274922804	0,008760236	0,113374753
RGD1562658_predicted	ENSRNOT000000045414	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 1700009P17 (predicted) (RGD1562658_predicted), mRNA [XM_573504]	0,269898366	0,00876044	0,113374753
Tcp1	NM_012670	Rattus norvegicus t-complex protein 1 (Tcp1), mRNA [NM_012670]	-0,228240716	0,008777022	0,113374753
Actl6a	NM_001039033	Rattus norvegicus actin-like 6A (Actl6a), mRNA [NM_001039033]	-0,355110164	0,008784577	0,113374753
LOC684822	XM_001072065	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (LOC684822), mRNA [XM_001072065]	-0,23056607	0,008820299	0,113587774
Usp16	ENSRNOT00000002173	Usp16 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q2KJ09] [ENSRNOT00000002173]	-0,317570085	0,008887307	0,113887017
Ucp2	NM_019354	Rattus norvegicus uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier) (Ucp2), mRNA [NM_019354]	0,403926911	0,00892721	0,113887017
BF403328	BF403328	BF403328 UI-R-CA1-biy-e-24-0-UI.s1 UI-R-CA1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CA1-biy-e-24-0-UI 3', mRNA sequence [BF403328]	0,240468406	0,008927861	0,113887017
AA817940	AA817940	UI-R-A0-af-h-08-0-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-af-h-08-0-UI 3', mRNA sequence [AA817940]	-0,359984849	0,008934668	0,113887017
Lat	NM_030853	Rattus norvegicus linker for activation of T cells (Lat), mRNA [NM_030853]	-0,239952779	0,00895389	0,113887017
TC588170	TC588170	Unknown	-0,303343473	0,008959138	0,113887017
Hexa	NM_001004443	Rattus norvegicus hexosaminidase A (Hexa), mRNA [NM_001004443]	0,373876699	0,009016027	0,114238809
Copb1	NM_080781	Rattus norvegicus coatomer protein complex, subunit beta 1 (Copb1), mRNA [NM_080781]	-0,281916854	0,009025465	0,114238809
Nup160_predicted	XM_230286	PREDICTED: Rattus norvegicus nucleoporin 160 (predicted) (Nup160_predicted), mRNA [XM_230286]	-0,537860833	0,009164436	0,115137515
ENSRNOT000000049064	ENSRNOT000000049064	similar to THUMP domain containing 3 (LOC302647), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_005711] [ENSRNOT000000049064]	-0,323569767	0,009176999	0,115137515
ENSRNOT000000055539	ENSRNOT000000055539	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to mitochondrial carrier protein MGC4399 (LOC691431), mRNA [XM_001078245]	0,368963441	0,009196407	0,115137515
ENSRNOT000000038196	ENSRNOT000000038196	Unknown	-0,530954706	0,009225658	0,115137515
Zfp91	XM_001078426	PREDICTED: Rattus norvegicus zinc finger protein 91 (Zfp91), mRNA [XM_001078426]	-0,257563085	0,009252507	0,115137515
XM_214188	XM_214188	Rattus norvegicus similar to ARP2/3 complex 41 kDa subunit (P41-ARC) (Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B) (LOC290282), mRNA [XM_214188]	0,20883382	0,009258859	0,115137515
Ociad1	NM_001013874	Rattus norvegicus OCIA domain containing 1 (Ociad1), mRNA [NM_001013874]	-0,236547507	0,009296211	0,115137515
Wbp4	NM_053766	Rattus norvegicus WW domain binding protein 4 (Wbp4), mRNA [NM_053766]	0,239771365	0,00929826	0,115137515
RGD1566077_predicted	XM_230509	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA A130038L21 (predicted) (RGD1566077_predicted), mRNA [XM_230509]	0,32087177	0,009316475	0,115137515
LOC361750	AY321330	Rattus norvegicus Ac2-067 mRNA, complete cds. [AY321330]	-0,340519631	0,009333524	0,115137515
Gnb1	NM_030987	Rattus norvegicus guanine nucleotide binding protein, beta 1 (Gnb1), mRNA [NM_030987]	-0,250432798	0,009343707	0,115137515
ENSRNOT00000048123	ENSRNOT00000048123	Unknown	-0,215675612	0,009344874	0,115137515
Ebna1bp2	NM_001008721	Rattus norvegicus EBNA1 binding protein 2 (Ebna1bp2), mRNA [NM_001008721]	-0,244346544	0,009360742	0,115137515
Gle1l	NM_001025731	Rattus norvegicus GLE1 RNA export mediator-like (yeast) (Gle1l), mRNA [NM_001025731]	-0,331412414	0,009369167	0,115137515
Txn12	NM_032614	Rattus norvegicus thioredoxin-like 2 (Txn12), mRNA [NM_032614]	-0,276205901	0,009402036	0,115301735
Dnaj2	NM_032079	Rattus norvegicus DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2 (Dnaj2), mRNA [NM_032079]	0,242650689	0,00945864	0,115697318
RGD1564961_predicted	XM_226650	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to retinoblastoma-binding protein 1 isoform I (predicted) (RGD1564961_predicted), mRNA [XM_226650]	0,312853456	0,00947344	0,115697318
Al111346	Al111346	Al111346 UI-R-Y0-ma-d-01-0-UI.s1 UI-R-Y0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-Y0-ma-d-01-0-UI 3', mRNA sequence [Al111346]	0,291485354	0,009594694	0,116936568
BF522056	BF522056	UI-R-Y0-aba-a-06-0-UI.r2 UI-R-Y0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-Y0-aba-a-06-0-UI 5', mRNA sequence [BF522056]	-0,284211127	0,009630676	0,117133595
AA899253	AA899253	AA899253 UI-R-E0-cz-g-07-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-cz-g-07-0-UI 3' similar to gi [AA899253]	0,488140813	0,009670155	0,117372247
LOC299190	XR_006232	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L23a (LOC299190), mRNA [XR_006232]	-0,332577449	0,009699397	0,117485935
Kua_predicted	ENSRNOT000000013962	similar to ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 (LOC684481), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_008719] [ENSRNOT000000013962]	-0,406334703	0,009733176	0,117653992
Xrn1_predicted	ENSRNOT000000014481	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Serine [XM_001062084]	-0,239492428	0,009765693	0,117804528
Bzrp	NM_012515	Rattus norvegicus benzodiazepine receptor, peripheral (Bzrp), mRNA [NM_012515]	0,222181446	0,009785489	0,117804528
Inpp5d	NM_019311	Rattus norvegicus inositol polyphosphate-5-phosphatase D (Inpp5d), mRNA [NM_019311]	0,308404449	0,009845909	0,11829099
H13_predicted	ENSRNOT000000010174	Rattus norvegicus similar to histocompatibility 13; presenilin-like protein 3 (LOC311545), mRNA [XM_230734]	0,370202971	0,00987311	0,118377189
Rpl15	NM_139114	Rattus norvegicus ribosomal protein L15 (Rpl15), mRNA [NM_139114]	-0,233183311	0,009918649	0,118682462

Q3 : Liste de 128 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
ENSRNOT00000025104	ENSRNOT00000025104	Ras-related protein Rab-6A (Rab-6) (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9WVB1] [ENSRNOT00000025104]	0,545890541	0,000139836	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,799844816	0,000271558	0,505389495
Rpl29	NM_017150	Rattus norvegicus ribosomal protein L29 (Rpl29), mRNA [NM_017150]	0,507064914	0,000484814	0,505389495
LOC367195	NM_001047920	Rattus norvegicus similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L7 (LOC367195), mRNA [NM_001047920]	-1,961776149	0,000519501	0,505389495
RGD1561034_predicted	ENSRNOT00000040672	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein MGC34805 (predicted) (RGD1561034_predicted), mRNA [XM_219097]	0,96733425	0,000553388	0,505389495
Kif5b	NM_057202	Rattus norvegicus kinesin family member 5B (Kif5b), mRNA [NM_057202]	0,792423518	0,000825472	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,642738497	0,000904384	0,505389495
Stat5b	NM_022380	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA [NM_022380]	0,492689947	0,000933406	0,505389495
Ctn	NM_021868	Rattus norvegicus cortactin (Ctnn), mRNA [NM_021868]	0,542053067	0,000999667	0,505389495
Hook3	AY310154	Rattus norvegicus Ac1288 mRNA, complete cds. [AY310154]	0,49295011	0,00127079	0,505389495
Dok4_predicted	ENSRNOT00000021037	PREDICTED: Rattus norvegicus docking protein 4 (predicted) (Dok4_predicted), mRNA [XM_341642]	-0,917218865	0,001550374	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,638172463	0,001690695	0,505389495
AI408425	AI408425	AI408425 EST236715 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone ROVEP26 3' end, mRNA sequence [AI408425]	0,37647606	0,00169235	0,505389495
A_44_P575605	A_44_P575605	Unknown	-0,453915439	0,001774985	0,505389495
XM_226639	XM_226639	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein CLONE24945 (LOC309945), mRNA [XM_226639]	0,465313489	0,001777623	0,505389495
Id3	NM_013058	Rattus norvegicus inhibitor of DNA binding 3 (Id3), mRNA [NM_013058]	-0,465090552	0,001802342	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,645284154	0,001904188	0,505389495
Clptm1_predicted	ENSRNOT00000024779	PREDICTED: Rattus norvegicus cleft lip and palate associated transmembrane protein 1 (predicted) (Clptm1_predicted), mRNA [XM_214859]	0,348260066	0,001919292	0,505389495
Tle1_predicted	ENSRNOT00000018421	Rattus norvegicus similar to groucho protein GRG1-L; Grg1-L (LOC362533), mRNA [XM_342851]	-0,416018454	0,002072393	0,505389495
Papd4	NM_001008372	Rattus norvegicus PAP associated domain containing 4 (Papd4), mRNA [NM_001008372]	0,473902859	0,002102844	0,505389495
AW917872	AW917872	AW917872 EST349176 Rat gene index, normalized rat, norvegicus, Bento Soares Rattus norvegicus cDNA clone RGIEJ61 5' end, mRNA sequence [AW917872]	0,465316236	0,002151108	0,505389495
Mcm8_predicted	ENSRNOT00000028897	PREDICTED: Rattus norvegicus minichromosome maintenance deficient 8 (S. cerevisiae) (predicted) (Mcm8_predicted), mRNA [XM_215825]	0,437472968	0,002213828	0,505389495
Als2cr13_predicted	ENSRNOT00000031261	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ38771 (LOC363236), mRNA [XM_343576]	0,62703349	0,00225868	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,557886029	0,002297075	0,505389495
Prpf4	ENSRNOT00000019910	Rattus norvegicus PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog (yeast), mRNA (cDNA clone IMAGE:7135397) [BC087165]	-0,474444147	0,00229854	0,505389495
Poli_predicted	ENSRNOT00000016189	PREDICTED: Rattus norvegicus polymerase (DNA directed), iota (predicted) (Poli_predicted), mRNA [XM_225844]	0,419799904	0,002350789	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,697493172	0,002373499	0,505389495
ENSRNOT00000004002	ENSRNOT00000004002	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2810460C24 (LOC287389), mRNA [XM_213316]	-0,412095885	0,002412013	0,505389495
ENSRNOT00000017294	ENSRNOT00000017294	PREDICTED: Rattus norvegicus membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 (predicted) (March8_predicted), mRNA [XM_232293]	0,490269489	0,002427486	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,693616053	0,002525844	0,505389495
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,643572641	0,002549696	0,505389495
A_44_P288785	A_44_P288785	Unknown	-0,386754412	0,002560523	0,505389495
Rnf138	NM_053588	Rattus norvegicus ring finger protein 138 (Rnf138), mRNA [NM_053588]	0,403777427	0,002581016	0,505389495
Cat	NM_012520	Rattus norvegicus catalase (Cat), mRNA [NM_012520]	-0,45218332	0,002866481	0,505389495
A_44_P891653	A_44_P891653	Unknown	0,380632754	0,002923657	0,505389495
Phf5a	NM_138888	Rattus norvegicus PHD finger protein 5A (Phf5a), mRNA [NM_138888]	-0,38056184	0,003102293	0,505389495
Nme7	NM_138532	Rattus norvegicus non-metastatic cells 7, protein expressed in (Nme7), mRNA [NM_138532]	0,421218812	0,003142601	0,505389495
RGD1562317_predicted	ENSRNOT00000031267	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to expressed sequence AW212394 (predicted) (RGD1562317_predicted), mRNA [XM_237146]	0,408301122	0,00315356	0,505389495
Msl2l1_predicted	ENSRNOT00000039593	Rattus norvegicus similar to KIAA1585 protein (LOC315959), mRNA [XM_236567]	0,350827312	0,003177012	0,505389495
Utx_predicted	ENSRNOT00000005742	PREDICTED: Rattus norvegicus ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, X chromosome (predicted) (Utx_predicted), mRNA [XM_228424]	0,373137462	0,003373397	0,505389495
XM_221479	XM_221479	Rattus norvegicus similar to BLOCK 23 (LOC288130), mRNA [XM_221479]	-0,381678631	0,00369467	0,505389495
A_44_P367900	A_44_P367900	Unknown	0,542647485	0,003740346	0,505389495
BE111604	BE111604	BE111604 UI-R-BJ1-avc-g-01-0-UI.s1 UI-R-BJ1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BJ1-avc-g-01-0-UI 3', mRNA sequence [BE111604]	0,73020101	0,003765256	0,505389495
LOC301891	XR_006669	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Spindlin-like protein 2 (SPIN-2) (LOC301891), mRNA [XR_006669]	0,460769276	0,00381716	0,505389495
RGD1562337_predicted	ENSRNOT00000051158	AY769435 mesoderm induction early response 1 N1 beta [Mus musculus] (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (51%) [TC612555]	0,422360183	0,003865542	0,505389495
Ogt	NM_017107	Rattus norvegicus O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) (Ogt), mRNA [NM_017107]	0,396675585	0,003966451	0,505389495
Cds1	NM_031242	Rattus norvegicus CDP-diacylglycerol synthase 1 (Cds1), mRNA [NM_031242]	0,338103932	0,003971958	0,505389495
Fth1	NM_012848	Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1), mRNA [NM_012848]	0,343237562	0,004001895	0,505389495
A_44_P265030	A_44_P265030	Unknown	0,483719697	0,004031054	0,505389495
Arbp	NM_022402	Rattus norvegicus acidic ribosomal phosphoprotein P0 (Arbp), mRNA [NM_022402]	-0,366429534	0,004156798	0,505389495
Cdkn1b	NM_031762	Rattus norvegicus cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Cdkn1b), mRNA [NM_031762]	0,318879054	0,004297574	0,505389495
Pou2f3	X67303	RNOV1POU.R.norvegicus mRNA for Rov 1 Pou-homeodomain protein [X67303]	0,348043934	0,004361945	0,505389495
ENSRNOT00000009439	ENSRNOT00000009439	PREDICTED: Rattus norvegicus PAX interacting [with transcription-activation domain] protein 1 (predicted) (Paxip1_predicted), mRNA [XM_231271]	-0,408689877	0,004405125	0,505389495
Dynl12	NM_080697	Rattus norvegicus dynein light chain LC8-type 2 (Dynl12), mRNA [NM_080697]	0,547359565	0,004418166	0,505389495
ENSRNOT00000059328	ENSRNOT00000059328	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC680615), mRNA [XM_001058007]	0,404378981	0,00444527	0,505389495
ENSRNOT000000044446	ENSRNOT000000044446	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to H2A histone family, member J (LOC690795), mRNA [XM_001075643]	0,485004558	0,004497208	0,505389495
LOC291516	XM_225786	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Spindlin-like protein 2 (SPIN-2) (LOC291516), mRNA [XM_225786]	0,355209352	0,004545122	0,505389495
Med28_predicted	ENSRNOT00000004912	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 28 (Mediator complex subunit 28) (Med23 homolog). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P68943] [ENSRNOT00000004912]	-0,409467926	0,004628513	0,505389495
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,464014348	0,0047431	0,505389495
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,397037367	0,004750258	0,505389495
RGD1564767_predicted	NM_001024282	Rattus norvegicus Histone H2a (predicted) (RGD1564767_predicted), mRNA [NM_001024282]	0,43490484	0,004781258	0,505389495
XM_219839	XM_219839	Rattus norvegicus similar to S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (AdoMetDC) (SamDC) (LOC309358), mRNA [XM_219839]	0,443228758	0,004790134	0,505389495
Cxcr4	NM_022205	Rattus norvegicus chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4), mRNA [NM_022205]	0,33762708	0,004797384	0,505389495
LOC365232	XM_001070056	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to karyopherin (importin) alpha 4 (predicted) (LOC365232), mRNA [XM_001070056]	0,458309308	0,004946522	0,505389495
Fth1	NM_012848	Rattus norvegicus ferritin, heavy polypeptide 1 (Fth1), mRNA [NM_012848]	0,334985263	0,004967297	0,505389495
ENSRNOT00000037986	ENSRNOT00000037986	Unknown	-0,426600591	0,005025457	0,505389495

Q3 : Liste de 128 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	logRatio	p-value	Adjusted p-value
ENSRNOT0000047696	ENSRNOT0000047696	Histone H2A type 1. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P02262] [ENSRNOT0000047696]	0,458079739	0,005054818	0,505389495
Hcn3	NM_053685	Rattus norvegicus hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 3 (Hcn3), mRNA [NM_053685]	0,332530514	0,005120455	0,505389495
RGD1562952_predicted	ENSRNOT00000061017	Rattus norvegicus similar to erbb2 interacting protein; densin-180-like protein; erbb2-interacting protein (LOC365662), mRNA [XM_345148]	0,37620909	0,005241354	0,505389495
AI044674	AI044674	UI-R-C1-jx-h-09-O-UI.s1 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C1-jx-h-09-O-UI 3', mRNA sequence [AI044674]	0,378943094	0,0053082	0,505389495
Vps45	NM_172072	Rattus norvegicus vacuolar protein sorting 45 (yeast) [Vps45], mRNA [NM_172072]	-0,343623648	0,00531188	0,505389495
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,446070667	0,005368661	0,505389495
Y17323	Y17323	Rattus norvegicus CDK109 mRNA. [Y17323]	0,372645947	0,005440005	0,505389495
ENSRNOT0000059342	ENSRNOT0000059342	Histone H2A type 3. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4FZT6] [ENSRNOT0000059342]	0,433647218	0,005494547	0,505389495
LOC133386	XR_006182	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ubiquitin specific protease 15 (LOC133386), mRNA [XR_006182]	0,300664065	0,00549578	0,505389495
BF557013	BF557013	BF557013 UI-R-C0-hm-e-03-O-UI.r1 UI-R-C0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C0-hm-e-03-O-UI 5', mRNA sequence [BF557013]	-0,414392752	0,005513076	0,505389495
ENSRNOT00000006727	ENSRNOT00000006727	PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 (predicted) (Cpeb2_predicted), mRNA [XM_341227]	0,407870723	0,005597995	0,506509501
Fzr1_predicted	ENSRNOT00000005624	PREDICTED: Rattus norvegicus fizzy [XM_243390]	0,355296754	0,005671107	0,506546156
ENSRNOT0000017550	ENSRNOT0000017550	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to ring finger protein 127 (predicted) (RGD1565451_predicted), mRNA [XM_233279]	0,724994115	0,00604383	0,518916933
Ptpre	ENSRNOT00000021359	Protein tyrosine phosphatase epsilon (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q9WV21] [ENSRNOT00000021359]	0,357760509	0,006205884	0,518916933
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,567302593	0,006243787	0,518916933
Klf6	NM_031642	Rattus norvegicus Kruppel-like factor 6 (Klf6), mRNA [NM_031642]	0,341424562	0,006298033	0,518916933
LOC300768	XM_217183	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to KIAA0925 protein (LOC300768), mRNA [XM_217183]	-0,392926471	0,006368524	0,518916933
Bach1_predicted	ENSRNOT00000002151	PREDICTED: Rattus norvegicus BTB and CNC homology 1 (predicted) (Bach1_predicted), mRNA [XM_221712]	0,567412665	0,006380601	0,518916933
Dnajb11	NM_001015021	Rattus norvegicus Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11 (Dnajb11), mRNA [NM_001015021]	0,361636333	0,006396958	0,518916933
ENSRNOT00000041929	ENSRNOT00000041929	Histone H2A type 3. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4FZT6] [ENSRNOT00000041929]	0,412850229	0,006405462	0,518916933
ENSRNOT00000043415	ENSRNOT00000043415	PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (predicted) (Cpeb4_predicted), mRNA [XM_220269]	0,416471149	0,0066622	0,530575605
AA799762	AA799762	AA799762 EST189259 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAF06 3' end, mRNA sequence [AA799762]	0,357818117	0,006857383	0,530575605
Dio3	NM_017210	Rattus norvegicus deiodinase, iodothyronine, type III (Dio3), mRNA [NM_017210]	-0,292284243	0,006865421	0,530575605
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,390583615	0,006875079	0,530575605
Rab10	M83677	RATRAB10X Sprague-Dawley (clone LR83) RAB10 mRNA, complete cds [M83677]	0,476058495	0,006930154	0,530575605
Dnajc5	NM_024161	Rattus norvegicus Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 (Dnajc5), mRNA [NM_024161]	0,441805621	0,007041959	0,531125429
TC610847	TC610847	MUSPURNU2P purine nucleoside phosphorylase (Mus musculus) [exp=-1; wgp=0; cg=0], partial (15%) [TC610847]	-0,348581248	0,007105339	0,531125429
RGD1308557_predicted	ENSRNOT00000012551	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to homolog of rat p47 (predicted) (RGD1308557_predicted), mRNA [XM_232664]	0,601543782	0,007199668	0,531125429
Mctp1_predicted	ENSRNOT00000017828	PREDICTED: Rattus norvegicus multiple C2 domains, transmembrane 1 (predicted) (Mctp1_predicted), mRNA [XM_001054964]	0,421591714	0,007242273	0,531125429
Tbc1d20	NM_001004281	Rattus norvegicus TBC1 domain family, member 20 (Tbc1d20), mRNA [NM_001004281]	0,329746048	0,007368463	0,533143459
Cnot6l_predicted	ENSRNOT00000002843	PREDICTED: Rattus norvegicus CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like (predicted) (Cnot6l_predicted), mRNA [XM_341191]	0,409405757	0,007790707	0,533143459
AI044674	AI044674	UI-R-C1-jx-h-09-O-UI.s1 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C1-jx-h-09-O-UI 3', mRNA sequence [AI044674]	0,394423735	0,007942915	0,533143459
Sor11_predicted	ENSRNOT00000059971	LR11 (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q9RON2] [ENSRNOT00000059971]	0,349782661	0,008062056	0,533143459
Hn1	NM_001005876	Rattus norvegicus hematological and neurological expressed sequence 1 (Hn1), mRNA [NM_001005876]	0,346477908	0,008118999	0,533143459
LOC290577	XR_006087	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC290577 (LOC290577), mRNA [XR_006087]	0,311659468	0,00824256	0,533143459
Rab14	NM_053589	Rattus norvegicus RAB14, member RAS oncogene family (Rab14), mRNA [NM_053589]	0,268911772	0,008405623	0,533143459
A_44_P867638	A_44_P867638	Unknown	0,420776133	0,008521435	0,533143459
lh	XM_576589	PREDICTED: Rattus norvegicus Indian hedgehog homolog, (Drosophila) (lh), mRNA [XM_576589]	-0,284580483	0,008554396	0,533143459
Josd2_predicted	ENSRNOT00000026379	PREDICTED: Rattus norvegicus Josephin domain containing 2 (predicted) (Josd2_predicted), mRNA [XM_214929]	0,547782236	0,00858926	0,533143459
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	0,380946468	0,008604508	0,533143459
RGD1565757_predicted	ENSRNOT00000028561	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA F830029L24 (LOC294863), mRNA [XM_215515]	0,348096539	0,00865741	0,533143459
TC623649	TC623649	Unknown	0,441647614	0,00871772	0,533143459
LOC680027	XM_001055214	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1 (LOC680027), mRNA [XM_001055214]	0,283340644	0,008750706	0,533143459
Ddx3x	ENSRNOT00000039551	Rattus norvegicus similar to RNA helicase (LOC317335), mRNA [XM_228701]	0,494844388	0,00880557	0,533143459
LOC363146	NM_001014214	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ10496 (LOC363146), mRNA [NM_001014214]	0,358673578	0,00885729	0,533143459
Dgat2	NM_001012345	Rattus norvegicus diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse) (Dgat2), mRNA [NM_001012345]	0,305326315	0,008876607	0,533143459
ENSRNOT00000046876	ENSRNOT00000046876	PREDICTED: Rattus norvegicus matrix metalloproteinase 25 (predicted) (Mmp25_predicted), mRNA [XM_001055465]	0,451967856	0,008894312	0,533143459
ENSRNOT00000046191	ENSRNOT00000046191	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC306962), mRNA [XM_225372]	0,392166219	0,008944434	0,533143459
TC605283	TC605283	Q91VM4_MOUSE (Q91VM4) BC011467 protein (Fragment), partial (9%) [TC605283]	-0,497107952	0,008952782	0,533143459
RGD1305961_predicted	ENSRNOT00000007701	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein DKFZp566A1524 (predicted) (RGD1305961_predicted), mRNA [XM_216666]	0,460095611	0,008999592	0,533143459
XM_237243	XM_237243	Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide) (LOC316469), mRNA [XM_237243]	0,346197471	0,009000836	0,533143459
Srp54	NM_053871	Rattus norvegicus signal recognition particle 54 (Srp54), mRNA [NM_053871]	-0,341694878	0,009147319	0,533143459
Acads	NM_022512	Rattus norvegicus acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain (Acads), mRNA [NM_022512]	1,631687278	0,009169605	0,533143459
Ddx3x	BC085914	Rattus norvegicus DEAD [BC085914]	0,355268917	0,009250652	0,533143459
Npepps	ENSRNOT00000031045	Npepps protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q3BBQ9] [ENSRNOT00000031045]	0,372097782	0,00926957	0,533143459
Zfp406_predicted	XM_343255	PREDICTED: Rattus norvegicus zinc finger protein 406 (predicted) (Zfp406_predicted), mRNA [XM_343255]	0,303401497	0,009423283	0,533143459
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,680201433	0,009468886	0,533143459
Plk1	NM_017100	Rattus norvegicus polo-like kinase 1 (Drosophila) (Plk1), mRNA [NM_017100]	-0,352092881	0,009537349	0,533143459
AA818380	AA818380	AA818380 UI-R-A0-at-f-10-O-UI.s1 UI-R-A0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A0-at-f-10-O-UI 3' similar to gb [AA818380]	0,366835573	0,009711982	0,533143459
Egr1	NM_012551	Rattus norvegicus early growth response 1 (Egr1), mRNA [NM_012551]	-0,401116884	0,009846525	0,533143459
A_43_P22707	A_43_P22707	Unknown	0,261393186	0,009939943	0,533143459
Zfp265	NM_031616	Rattus norvegicus zinc finger protein 265 (Zfp265), mRNA [NM_031616]	-0,578609906	0,00997251	0,533143459

Q4 : liste de 171 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	log(Ratio)	p-value	Adjusted p-value
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,843270704	3,09E-05	0,093358662
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	1,036797456	3,33E-05	0,093358662
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,916998335	7,91E-05	0,147763544
LOC367195	NM_001047920	Rattus norvegicus similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L7 (LOC367195), mRNA [NM_001047920]	-2,027871124	0,000124546	0,14821485
Vvuf	ENSRNOT00000026643	von Willebrand factor (Fragment). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q62935] [ENSRNOT00000026643]	0,798841119	0,000153797	0,14821485
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,83669485	0,000158773	0,14821485
Kmo	NM_021593	Rattus norvegicus kynurenine 3-monoxygenase (kynurenine 3-hydroxylase) (Kmo), mRNA [NM_021593]	1,174402065	0,000252856	0,186864472
Slc6a8	NM_017348	Rattus norvegicus solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (Slc6a8), mRNA [NM_017348]	0,845786661	0,000267987	0,186864472
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,760126504	0,000300264	0,186864472
COX2	ENSRNOT00000043693	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1) [Cytochrome c oxidase polypeptide II]. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P00406] [ENSRNOT00000043693]	-1,573937145	0,000337745	0,189170789
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,778741313	0,000640659	0,318893573
Rab10	M83677	RATRAB10X Sprague-Dawley (clone LRB3) RAB10 mRNA, complete cds [M83677]	0,508171564	0,000742867	0,318893573
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,837187409	0,000864583	0,318893573
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,810778843	0,000956837	0,318893573
Stat5b	NM_022380	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 5B (Stat5b), mRNA [NM_022380]	0,50927008	0,000971414	0,318893573
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,862265553	0,001068169	0,318893573
Tbc1d20	NM_001004281	Rattus norvegicus TBC1 domain family, member 20 (Tbc1d20), mRNA [NM_001004281]	0,519836835	0,001085848	0,318893573
RGD1562337_predicted	ENSRNOT00000051158	AY769435 mesoderm induction early response 1 N1 beta [Mus musculus] (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (51%) [TC612555]	0,515493083	0,001134994	0,318893573
Rnf36	NM_001013160	Rattus norvegicus ring finger protein 36 (Rnf36), mRNA [NM_001013160]	0,833931943	0,001179949	0,318893573
Fabp3	NM_024162	Rattus norvegicus fatty acid binding protein 3 (Fabp3), mRNA [NM_024162]	-0,747799457	0,000133296	0,318893573
Hook3	AY310154	Rattus norvegicus Ac1288 mRNA, complete cds. [AY310154]	0,592308362	0,00138757	0,318893573
Rab10	NM_017359	Rattus norvegicus RAB10, member RAS oncogene family (Rab10), mRNA [NM_017359]	0,458560467	0,001457852	0,318893573
Zcch10	AY387053	Rattus norvegicus LRRGT00067 mRNA, complete cds. [AY387053]	-0,482201178	0,001494833	0,318893573
AA875536	AA875536	UI-R-E0-cv-g-06-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-cv-g-06-0-UI 3', mRNA sequence [AA875536]	-0,4678596	0,001532486	0,318893573
Rnf139_predicted	ENSRNOT000000011891	TRC8 (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q9JLC5] [ENSRNOT000000011891]	0,466502553	0,001562438	0,318893573
BU760453	BU760453	UI-R-FS1-cqi-n-16-0-UI.s1 UI-R-FS1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-FS1-cqi-n-16-0-UI 3', mRNA sequence [BU760453]	0,569284199	0,001648488	0,318893573
Dynl12	NM_080697	Rattus norvegicus dynein light chain LC8-type 2 (Dynl12), mRNA [NM_080697]	0,601976863	0,001804379	0,318893573
Stat3	NM_012747	Rattus norvegicus signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), mRNA [NM_012747]	0,78217192	0,001805776	0,318893573
LOC311687	XR_006742	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L7a (LOC311687), mRNA [XR_006742]	0,64976725	0,001828933	0,318893573
LOC302495	XR_006183	PREDICTED: Rattus norvegicus hypothetical LOC302495 (LOC302495), mRNA [XR_006183]	0,541513448	0,001846105	0,318893573
LOC365756	XR_005900	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (LOC365756), mRNA [XR_005900]	-0,493900973	0,001895301	0,318893573
Clybl	XM_240311	PREDICTED: Rattus norvegicus citrate lyase beta like (Clybl), mRNA [XM_240311]	-0,525052973	0,001906048	0,318893573
RT1-CI	NM_206848	Rattus norvegicus RT1 class Ib, locus CI (RT1-CI), mRNA [NM_206848]	-0,779609322	0,001922701	0,318893573
Arbp	NM_022402	Rattus norvegicus acidic ribosomal phosphoprotein P0 (Arbp), mRNA [NM_022402]	-0,415103178	0,001984131	0,318893573
TC598143	TC598143	Unknown	0,38624155	0,001992729	0,318893573
C3orf6h	NM_182736	Rattus norvegicus putative C3orf6 protein homolog (human) (C3orf6h), mRNA [NM_182736]	-0,647495807	0,002165382	0,321606944
BQ203246	BQ203246	UI-R-DN1-cmt-f-22-0-UI.s1 UI-R-DN1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-DN1-cmt-f-22-0-UI 3', mRNA sequence [BQ203246]	-0,473512066	0,002172497	0,321606944
ENSRNOT00000039532	ENSRNOT00000039532	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Inner nuclear membrane protein Man1 (LEM domain containing protein 3) (predicted) (RGD1561001_predicted), mRNA [XM_001081049]	0,393702978	0,002218824	0,321606944
Cxcr4	NM_022205	Rattus norvegicus chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4), mRNA [NM_022205]	0,364106572	0,002426462	0,321606944
Tsc22d3	NM_031345	Rattus norvegicus TSC22 domain family 3 (Tsc22d3), mRNA [NM_031345]	0,478117209	0,002435141	0,321606944
Nrgn	NM_024140	Rattus norvegicus neurogranin (Nrgn), mRNA [NM_024140]	0,405652441	0,002619391	0,321606944
Lrrk2	ENSRNOT00000005438	Lrrk2 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5BJM3] [ENSRNOT00000005438]	0,412921616	0,002695554	0,321606944
XM_214487	XM_214487	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 5730599O09 (LOC291188), mRNA [XM_214487]	-0,339525993	0,002881264	0,321606944
ENSRNOT00000014357	ENSRNOT00000014357	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to TGF beta-inducible nuclear protein 1 (L-name-related protein 42) (LNR42) (LOC682004), mRNA [XM_001059323]	-0,37202094	0,003043534	0,321606944
LOC501650	NM_001047971	Rattus norvegicus hypothetical protein LOC501650 (LOC501650), mRNA [NM_001047971]	-0,430982309	0,003101042	0,321606944
Olr546_predicted	NM_001001054	Rattus norvegicus olfactory receptor 546 (predicted) (Olr546_predicted), mRNA [NM_001001054]	-0,392210297	0,003102097	0,321606944
Rassf2	NM_001037096	Rattus norvegicus Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2 (Rassf2), mRNA [NM_001037096]	0,416637679	0,003140436	0,321606944
Cad	ENSRNOT00000039709	PREDICTED: Rattus norvegicus carbamyl phosphatase synthetase 2 (mapped) (Cad_mapped), mRNA [XM_343027]	-0,43265747	0,003175329	0,321606944
Bambi	NM_139082	Rattus norvegicus BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog (Xenopus laevis) (Bambi), mRNA [NM_139082]	0,601063689	0,003288538	0,321606944
AA799762	AA799762	AA799762 EST189259 Normalized rat heart, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RHEAF06 3' end, mRNA sequence [AA799762]	0,531456586	0,003296322	0,321606944
ENSRNOT00000039144	ENSRNOT00000039144	Pkm2 protein. [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q6P750] [ENSRNOT00000039144]	-0,431662254	0,003361469	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,448552249	0,003452124	0,321606944
Rab6b_predicted	ENSRNOT00000012219	PREDICTED: Rattus norvegicus RAB6B, member RAS oncogene family (predicted) (Rab6b_predicted), mRNA [XM_343459]	-0,591509815	0,003466009	0,321606944
RGD1566016_predicted	XM_341116	Rattus norvegicus similar to KIAA0456 protein (LOC360840), mRNA [XM_341116]	-0,356386965	0,003520715	0,321606944
Cldn7	NM_031702	Rattus norvegicus claudin 7 (Cldn7), mRNA [NM_031702]	-0,437815539	0,003589008	0,321606944
LOC300768	NM_217183	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to KIAA0925 protein (LOC300768), mRNA [XM_217183]	-0,491135601	0,00365789	0,321606944
Olr3_predicted	NM_001000110	Rattus norvegicus olfactory receptor 3 (predicted) (Olr3_predicted), mRNA [NM_001000110]	-0,451142708	0,003740678	0,321606944
Lrrc48	NM_001013857	Rattus norvegicus leucine rich repeat containing 48 (Lrrc48), mRNA [NM_001013857]	0,519664774	0,003929344	0,321606944

Q4 : liste de 171 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	log(Ratio)	p-value	Adjusted p-value
Rbm24_predicted	ENSRNOT00000060500	PREDICTED: Rattus norvegicus RNA binding motif protein 24 (predicted) (Rbm24_predicted), mRNA [XM_214446]	0,409653142	0,003929818	0,321606944
ENSRNOT00000025412	ENSRNOT00000025412	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Ribonuclease P protein subunit p30 (RNaseP protein p30) (RNase P subunit 2) (LOC685332), mRNA [XM_001063377]	-0,403305627	0,003948034	0,321606944
Ogt	NM_017107	Rattus norvegicus O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) (Ogt), mRNA [NM_017107]	0,424414133	0,003977905	0,321606944
Cxhc5	NM_001007628	Rattus norvegicus CXHC finger 5 (Cxhc5), mRNA [NM_001007628]	-0,394946749	0,004038905	0,321606944
ENSRNOT00000059672	ENSRNOT00000059672	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to granzyme N (LOC691668), mRNA [XM_001079204]	-0,42158723	0,004136929	0,321606944
Csnk1d	NM_139060	Rattus norvegicus casein kinase 1, delta (Csnk1d), mRNA [NM_139060]	0,321943856	0,004140768	0,321606944
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,423341615	0,004176449	0,321606944
A_44_P567275	A_44_P567275	Unknown	-0,332488497	0,004177012	0,321606944
ENSRNOT00000059342	ENSRNOT00000059342	Histone H2A type 3. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4FZT6] [ENSRNOT00000059342]	0,541608352	0,004177561	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,397098053	0,00430763	0,321606944
Dyrk1a	NM_012791	Rattus norvegicus dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A (Dyrk1a), mRNA [NM_012791]	0,415675089	0,004308424	0,321606944
ENSRNOT00000047696	ENSRNOT00000047696	Histone H2A type 1. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P02262] [ENSRNOT00000047696]	0,538588651	0,004360248	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,41270814	0,004421193	0,321606944
B4galnt1	NM_022860	Rattus norvegicus beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1 (B4galnt1), mRNA [NM_022860]	-0,384400108	0,00442599	0,321606944
TC589877	TC589877	Unknown	0,445106568	0,004590797	0,321606944
Ddit3	NM_024134	Rattus norvegicus DNA-damage inducible transcript 3 (Ddit3), mRNA [NM_024134]	0,401707153	0,004609832	0,321606944
Eil2	ENSRNOT00000032974	EIL2 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q2NL49] [ENSRNOT00000032974]	0,623626346	0,004825588	0,321606944
Pak6_predicted	ENSRNOT00000010471	PREDICTED: Rattus norvegicus p21 (CDKN1A)-activated kinase 6 (predicted) (Pak6_predicted), mRNA [XM_230519]	0,411010885	0,004931214	0,321606944
RGD1560818_predicted	XR_009205	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ38944 (predicted) (RGD1560818_predicted), mRNA [XR_009205]	-0,324303613	0,004932363	0,321606944
Kb1	NM_001008802	Rattus norvegicus type II keratin Kb1 (Kb1), mRNA [NM_001008802]	0,385420971	0,005027552	0,321606944
Hspe1	NM_012966	Rattus norvegicus heat shock 10 kDa protein 1 (chaperonin 10) (Hspe1), mRNA [NM_012966]	-0,393402332	0,005048669	0,321606944
P4ha1	NM_172062	Rattus norvegicus procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha 1 polypeptide (P4ha1), mRNA [NM_172062]	0,418819388	0,005085276	0,321606944
Rab15	M83679	RATRAB15X Sprague-Dawley (clone LRB9) RAB15 mRNA, complete cds [M83679]	-0,51133443	0,00543775	0,321606944
RGD1305961_predicted	ENSRNOT00000007701	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to hypothetical protein DKFZp566A1524 (predicted) (RGD1305961_predicted), mRNA [XM_216666]	0,662107537	0,005455454	0,321606944
RGD1307010	NM_001014227	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 2700085E05 (RGD1307010), mRNA [NM_001014227]	-0,318342436	0,005467685	0,321606944
RGD1564767_predicted	NM_001024282	Rattus norvegicus Histone H2a (predicted) (RGD1564767_predicted), mRNA [NM_001024282]	0,540214225	0,005484179	0,321606944
Pdzk8_predicted	ENSRNOT00000012549	Rattus norvegicus hypothetical LOC308000 (LOC308000), mRNA [XM_217651]	0,313043522	0,005530256	0,321606944
ENSRNOT00000044446	ENSRNOT00000044446	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to H2A histone family, member J (LOC690795), mRNA [XM_001075643]	0,529366462	0,005608946	0,321606944
RGD1559931_predicted	XM_224620	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Ankyrin repeat domain protein 28 (predicted) (RGD1559931_predicted), mRNA [XM_224620]	0,572194963	0,005714186	0,321606944
ENSRNOT00000059328	ENSRNOT00000059328	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC680615), mRNA [XM_001058007]	0,508416154	0,005723681	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,376196243	0,005748829	0,321606944
BF290343	BF290343	BF290343 EST454934 Rat Gene Index, normalized rat, Rattus norvegicus cDNA Rattus norvegicus cDNA clone RGIHV17 5' sequence, mRNA sequence [BF290343]	-0,517767639	0,005873907	0,321606944
Acadsb	NM_013084	Rattus norvegicus acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain (Acadsb), mRNA [NM_013084]	0,533727381	0,005929771	0,321606944
Exoc6	NM_019277	Rattus norvegicus exocyst complex component 6 (Exoc6), mRNA [NM_019277]	-0,368322573	0,005988305	0,321606944
Als2cr13_predicted	ENSRNOT00000031261	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ38771 (LOC363236), mRNA [XM_343576]	0,641365594	0,005989617	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,396090712	0,006005446	0,321606944
Ppt2	NM_019367	Rattus norvegicus palmitoyl-protein thioesterase 2 (Ppt2), mRNA [NM_019367]	-0,358498927	0,006035577	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,395822145	0,006085793	0,321606944
Wsb1	NM_001025664	Rattus norvegicus WD repeat and SOCS box-containing 1 (Wsb1), transcript variant 2, mRNA [NM_001025664]	0,312460454	0,006263169	0,321606944
ENSRNOT00000046191	ENSRNOT00000046191	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to histone 2a (LOC306962), mRNA [XM_225372]	0,508011272	0,006347915	0,321606944
Dcp2_predicted	ENSRNOT00000015645	PREDICTED: Rattus norvegicus DCP2 decapping enzyme homolog (S. cerevisiae) (predicted) (Dcp2_predicted), mRNA [XM_225963]	0,364400198	0,006357921	0,321606944
Mrip	NM_053814	Rattus norvegicus myosin phosphatase-Rho interacting protein (Mrip), transcript variant 1, mRNA [NM_053814]	-0,474216099	0,006381773	0,321606944
Mpg	NM_012601	Rattus norvegicus N-methylpurine-DNA glycosylase (Mpg), mRNA [NM_012601]	-0,365391498	0,006493364	0,321606944
Prpf39_predicted	ENSRNOT00000006096	PREDICTED: Rattus norvegicus PRP39 pre-mRNA processing factor 39 homolog (yeast) (predicted) (Prpf39_predicted), mRNA [XM_234238]	0,332322042	0,006554473	0,321606944
Lamp2	NM_017068	Rattus norvegicus lysosomal membrane glycoprotein 2 (Lamp2), mRNA [NM_017068]	0,375515825	0,006610204	0,321606944
Lrrc30_predicted	ENSRNOT00000049720	PREDICTED: Rattus norvegicus leucine rich repeat containing 30 (predicted) (Lrrc30_predicted), mRNA [XM_237538]	0,438274314	0,006687897	0,321606944
ENSRNOT00000021484	ENSRNOT00000021484	Zfp131 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q4G013] [ENSRNOT00000021484]	-0,364988187	0,006735201	0,321606944
ENSRNOT00000018684	ENSRNOT00000018684	PREDICTED: Rattus norvegicus ring finger protein 149 (Rnf149), mRNA [XM_343561]	0,482293107	0,006747257	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,42277402	0,006760741	0,321606944
ENSRNOT00000020457	ENSRNOT00000020457	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to profilin 3 (LOC685936), mRNA [XM_001065833]	0,35235225	0,006857294	0,321606944
RGD1308877_predicted	ENSRNOT00000028893	similar to CGI-09 protein (LOC365444), mRNA [Source:RefSeq_dna;Acc:XR_005933] [ENSRNOT00000028893]	-0,300954073	0,006867041	0,321606944
A_44_P867638	A_44_P867638	Unknown	0,414218976	0,006915828	0,321606944
TC629122	TC629122	Q5NB21_ORYSA (Q5NB21) Hydroxyproline-rich glycoprotein-like, partial (3%) [TC629122]	-0,396983588	0,007000519	0,321606944
ENSRNOT00000025773	ENSRNOT00000025773	Protein orai-3 (Transmembrane protein 142C). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q6AXR8] [ENSRNOT00000025773]	-0,416872808	0,007110339	0,321606944
Lgals8	NM_053862	Rattus norvegicus lectin, galactoside-binding, soluble 8 (Lgals8), mRNA [NM_053862]	0,591636746	0,007159221	0,321606944
Ddx3x	ENSRNOT00000039551	Rattus norvegicus similar to RNA helicase (LOC317335), mRNA [XM_228701]	0,375440804	0,007199841	0,321606944
ENSRNOT00000041929	ENSRNOT00000041929	Histone H2A type 3. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q4FZT6] [ENSRNOT00000041929]	0,515059047	0,007205948	0,321606944
LOC315508	NM_001034000	Rattus norvegicus similar to mKIAA0056 protein (LOC315508), mRNA [NM_001034000]	-0,530457113	0,007280852	0,321606944

Q4 : liste de 171 spots déclarés différentiellement exprimés

GeneName	SystematicName	Description	log(Ratio)	p-value	Adjusted p-value
LOC361014	NM_001014136	Rattus norvegicus similar to peptide N-glycanase (LOC361014), mRNA [NM_001014136]	0,300222589	0,007290893	0,321606944
Nat2	NM_053854	Rattus norvegicus N-Acetyltransferase-2 (arylamine N-acetyltransferase) (Nat2), mRNA [NM_053854]	-0,405778164	0,007323268	0,321606944
BF546374	BF546374	UI-R-C1-kx-e-08-0-UI.r1 UI-R-C1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-C1-kx-e-08-0-UI 5', mRNA sequence [BF546374]	-0,449364663	0,007410525	0,321606944
Zfand3	NM_001012175	Rattus norvegicus zinc finger, AN1-type domain 3 (Zfand3), mRNA [NM_001012175]	0,364722789	0,007462667	0,321606944
ENSRNOT00000029570	ENSRNOT00000029570	Unknown	-0,420047581	0,007482664	0,321606944
Cebpb	NM_024125	Rattus norvegicus CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb), mRNA [NM_024125]	0,669657304	0,00748637	0,321606944
ENSRNOT00000000707	ENSRNOT00000000707	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) (Protein kinase C substrate 80 kDa protein). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P30009] [ENSRNOT00000000707]	-0,378997169	0,00760784	0,321606944
Rbbp6	ENSRNOT00000035770	Rbbp6 protein (Fragment). [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q5EB85] [ENSRNOT00000035770]	0,328796985	0,007682325	0,321606944
AW529005	AW529005	AW529005 UI-R-BT1-aka-a-11-0-UI.s1 UI-R-BT1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-BT1-aka-a-11-0-UI 3', mRNA sequence [AW529005]	-0,408962558	0,007682459	0,321606944
Hmox1	NM_012580	Rattus norvegicus heme oxygenase (decycling) 1 (Hmox1), mRNA [NM_012580]	-0,344934978	0,00769408	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,405257881	0,007807887	0,321606944
Pja2	NM_138896	Rattus norvegicus praja 2, RING-H2 motif containing (Pja2), mRNA [NM_138896]	0,4877282	0,00782053	0,321606944
Timp1	NM_053819	Rattus norvegicus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA [NM_053819]	0,389160775	0,007884611	0,321606944
Sat	NM_001007667	Rattus norvegicus spermidine/spermine N1-acetyl transferase (mapped) (Sat), mRNA [NM_001007667]	0,465634732	0,00790659	0,321606944
Vgll4	NM_001015004	Rattus norvegicus vestigial like 4 (Drosophila) (Vgll4), mRNA [NM_001015004]	-0,463423572	0,00790806	0,321606944
Hspa4	NM_153629	Rattus norvegicus heat shock protein 4 (Hspa4), mRNA [NM_153629]	-0,372646349	0,008010465	0,321606944
Smad2	NM_019191	Rattus norvegicus MAD homolog 2 (Drosophila) (Smad2), mRNA [NM_019191]	0,281802648	0,008070943	0,321606944
TC589544	TC589544	Unknown	0,381675138	0,008200242	0,321606944
Syap1	NM_001004253	Rattus norvegicus synapse associated protein 1 (Syap1), mRNA [NM_001004253]	0,437578088	0,008260677	0,321606944
Chpt1	NM_001007750	Rattus norvegicus choline phosphotransferase 1 (Chpt1), mRNA [NM_001007750]	0,38663754	0,008283624	0,321606944
ENSRNOT00000013790	ENSRNOT00000013790	Histone H2A type 1-E. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:POC170] [ENSRNOT00000013790]	0,450755655	0,008405836	0,321606944
ENSRNOT00000005384	ENSRNOT00000005384	Rattus norvegicus similar to dribble CG4258-PA (LOC314830), mRNA [XM_235128]	-0,353250061	0,008429244	0,321606944
Cdc34_predicted	NM_001013103	Rattus norvegicus cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae) (predicted) (Cdc34_predicted), mRNA [NM_001013103]	0,348152754	0,008445903	0,321606944
Slc15a4	ENSRNOT00000001277	peptide/histidine transporter [Source:RefSeq_peptide;Acc:NP_653359] [ENSRNOT00000001277]	0,360740746	0,008458142	0,321606944
XM_341846	XM_341846	Rattus norvegicus similar to Protein translation factor SU11 homolog (LOC361563), mRNA [XM_341846]	0,45433747	0,008510086	0,321606944
TC613177	TC613177	P97875_MOUSE (P97875) Jun dimerization protein 2 (Jundm2-pending protein), complete [TC613177]	0,401289348	0,00853899	0,321606944
Rragd_predicted	ENSRNOT00000009730	PREDICTED: Rattus norvegicus Ras-related GTP binding D (predicted) (Rragd_predicted), mRNA [XM_216363]	0,325644048	0,008542628	0,321606944
Elmo1_predicted	ENSRNOT00000025516	PREDICTED: Rattus norvegicus engulfment and cell motility 1, ced-12 homolog (C. elegans) (predicted) (Elmo1_predicted), mRNA [XM_341532]	0,499851807	0,008590855	0,321606944
RGD1309487	NM_001013909	Rattus norvegicus similar to hypothetical protein FLJ10233 (RGD1309487), mRNA [NM_001013909]	-0,381289468	0,008620434	0,321606944
Cebpb	NM_024125	Rattus norvegicus CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb), mRNA [NM_024125]	0,574567809	0,00863651	0,321606944
Psx1_predicted	XM_231064	PREDICTED: Rattus norvegicus placenta specific homeobox 1 (predicted) (Psx1_predicted), mRNA [XM_231064]	0,267555729	0,008679827	0,321606944
BM390804	BM390804	BM390804 UI-R-CN1-cjo-f-10-0-UI.s1 UI-R-CN1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CN1-cjo-f-10-0-UI 3', mRNA sequence [BM390804]	0,683776632	0,008801958	0,321606944
ENSRNOT000000042571	ENSRNOT000000042571	Rattus norvegicus similar to Beta-arrestin 2 (Arrestin, beta 2) (LOC365541), mRNA [XM_345084]	-1,183708165	0,008953006	0,321606944
A_44_P468756	A_44_P468756	Unknown	-0,288333054	0,00900466	0,321606944
RGD1309871_predicted	NM_001044241	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA 5730596K20 (predicted) (RGD1309871_predicted), mRNA [NM_001044241]	0,350297325	0,009023621	0,321606944
A_44_P982920	A_44_P982920	Unknown	-0,393831175	0,00908679	0,321606944
ENSRNOT000000045512	ENSRNOT000000045512	Histone H2A type 1-E. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:POC170] [ENSRNOT000000045512]	0,387706067	0,00910762	0,321606944
RGD1565757_predicted	ENSRNOT000000028561	Rattus norvegicus similar to RIKEN cDNA F830029L24 (LOC294863), mRNA [XM_215515]	0,347694518	0,009153944	0,321606944
Gk-rs2	NM_001004077	Rattus norvegicus glucokinase activity, related sequence 2 (Gk-rs2), mRNA [NM_001004077]	0,425506686	0,009244862	0,321606944
Cebpb	NM_024125	Rattus norvegicus CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (Cebpb), mRNA [NM_024125]	0,587948627	0,009248257	0,321606944
XM_237243	XM_237243	Rattus norvegicus similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) (PLA-X polypeptide) (LOC316469), mRNA [XM_237243]	0,356699042	0,009386829	0,321606944
Ankrd12_predicted	ENSRNOT000000017613	PREDICTED: Rattus norvegicus ankyrin repeat domain 12 (predicted) (Ankrd12_predicted), mRNA [XM_237588]	0,425828809	0,009435945	0,321606944
Phr1_predicted	ENSRNOT000000014583	PREDICTED: Rattus norvegicus pam, highwire, rpm 1 (predicted) (Phr1_predicted), mRNA [XM_214245]	0,301309533	0,009440815	0,321606944
AW141315	AW141315	AW141315 EST291356 Normalized rat brain, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBL61 5' end similar to translation initiation factor sui1 homolog, mRNA sequence [AW141315]	0,48093199	0,00955573	0,321606944
Ppp4r1	NM_080907	Rattus norvegicus protein phosphatase 4, regulatory subunit 1 (Ppp4r1), mRNA [NM_080907]	0,295214202	0,009654568	0,321606944
ENSRNOT000000043415	ENSRNOT000000043415	PREDICTED: Rattus norvegicus cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4 (predicted) (Cpeb4_predicted), mRNA [XM_220269]	0,446849524	0,009657579	0,321606944
BF417776	BF417776	BF417776 UI-R-CN0-blx-a-09-0-UI.s1 UI-R-CN0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-CN0-blx-a-09-0-UI 3', mRNA sequence [BF417776]	-0,386481742	0,009672652	0,321606944
lvns1abp_predicted	ENSRNOT000000059863	influenza virus NS1A binding protein [Source:RefSeq_peptide;Acc:NP_001040550] [ENSRNOT000000059863]	0,578063133	0,009692908	0,321606944
LOC680172	XM_001055992	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Methyl-CpG-binding domain protein 2 (Methyl-CpG-binding protein MBD2) (LOC680172), mRNA [XM_001055992]	0,88351718	0,009694674	0,321606944
Armxc2	NM_001014274	Rattus norvegicus armadillo repeat containing, X-linked 2 (Armxc2), mRNA [NM_001014274]	0,563104072	0,009718787	0,321606944
ENSRNOT000000004942	ENSRNOT000000004942	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to transmembrane emp24 protein transport domain containing 7 (LOC679060), mRNA [XM_001054517]	0,282553045	0,009740272	0,321606944
A_44_P723917	A_44_P723917	Unknown	-0,389471659	0,009770599	0,321606944
RGD1562047_predicted	ENSRNOT000000019234	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2) (predicted) (RGD1562047_predicted), mRNA [XM_573992]	-0,389115143	0,00978678	0,321606944
Hnrpr	NM_175603	Rattus norvegicus heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (Hnrpr), mRNA [NM_175603]	-0,378036068	0,009839136	0,321606944
Mrpl18_predicted	ENSRNOT000000020064	PREDICTED: Rattus norvegicus mitochondrial ribosomal protein L18 (predicted) (Mrpl18_predicted), mRNA [XM_214751]	-0,494625543	0,009941579	0,321606944

Références bibliographiques

- Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME and Van Wyk JJ. A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of the ovarian granulosa cell. *Endocrinology* (1984) **115**(3):1227-9.
- Bailly-Chouriberry L. Détection de l'administration de l'hormone de croissance équine recombinante : application au contrôle antidopage dans les courses hippiques Thèse de Doctorat. Université de Nantes. Faculté des sciences et techniques (2007).
- Bailly-Chouriberry L, Chu-Van E, Pinel G, Garcia P, Popot MA, André-Fontaine G, Bonnaire Y and Le Bizec B. Detection of secondary biomarker of met-eGH as a strategy to screen for somatotropin misuse in horseracing. *Analyst* (2008)(a)**133**(2): 270-6.
- Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot MA, Le Bizec B, Bonnaire Y. Identification of recombinant equine growth hormone in horse plasma by LC-MS/MS : a confirmatory analysis in doping control. *Analytical Chemistry* (2008)(b)**80**(21): 8340-8347.
- Benjamini Y and Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* (1995)**57**: 289-300.
- Boockfor FR, Hoeffler JP, and Frawley LS. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *American Journal of Physiology* (1986) **250**: E103-E105.
- Borromeo V, Berrini A, Gaggioli D and Secchi C. Heterophile antibody interference in a solid phase sandwich immunoassay for detection of equine growth hormone in plasma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2007)**115**(1-2): 1-9.
- Brook C and Marshall N. En bref...Endocrinologie. De Boeck Université, Paris (1998).
- Campbell NA. Biologie. Adaptation et révision scientifique de Richard Mathieu. De Boeck Université (1995).
- Capshaw EL, Thompson DL Jr, Kulinski KM, Johnson CA and Franch DD. Daily treatment of horses with equine somatotropin from 4 to 16 months of age. *Journal of Animal Science* (2001)**79**(12): 3137-47.
- Champion ZJ, James EA, Vickers MH, Breier BH and Casez PJ. The effects of bovine recombinant growth hormone administration on insulin-like growth factor-I and the haemopoietic system in thoroughbred geldings. *The Veterinary Journal* (2000)**160**(2): 147-152.
- Chatelain P, Penhoat A, Perrard-Sapori MH, Jaillard C, Naville D and Saez J. Maturation of steroidogenic cells: a target for IGF-I. *Acta Paediatrica Scandinavia Supplement* (1988)**347**: 104-9.

- Chilliard Y, Colleau JJ, Disenhaus C, Lerondelle C, Mouchet C and Paris A. L'hormone de croissance recombinante : intérêt et risques potentiels de son utilisation pour la production laitière bovine. *INRA Productions Animales* (1998)**11**(1): 15-32.
- Christensen RA, Malinowski K, Scanes CG and Hafs HD. Pulsatile release of somatotropin related to meal feeding and somatotropin response to secretagogues in horse. *Journal of Animal Science* (1997)**75**: 2770-2777.
- Conde RD, Paladini AC, Santome JA and Dellacha J. Isolation, purification and characterization of equine growth hormone. *European Journal of Biochemistry* (1973)**32**: 563-568.
- Courtot D and Jaussaud P. Le contrôle antidopage chez le cheval. Editions INRA (1990).
- Dart AJ, Little CB, Hughes CE, Chu Q, Dowling BA, Hodgson DR, Rose RJ and Johnson KA. Recombinant equine growth hormone administration: effects on synovial fluid biomarkers and cartilage metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal* (2003)**35**(3): 302-307.
- De Botton D, Janett F, Burger D, Imboden I, Kähn W and Thun R. The influence of equine somatotropin (EquiGen™) on semen quality and testosterone secretion in the stallion. Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Portoroz-Lipica, Slovenia. *Reproduction in Domestic Animals* (2006)**41**: 318.
- De Groot LJ. Endocrinology. Second Edition (1989).
- De Kock SS, Rodgers JP, Swanepoel BC, Faustino-Kemp J, Jackson JS, Houghton E, Noble GK and Sillence MN. Growth hormone abuse in the horse: Establishment of an insulin-like growth factor-1 database. In *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarians*. Cambridge, UK, Editions RB Williams, E Houghton & JF Wade. Newmarket: R&W Publications. (2000)311–313.
- De Kock SS, Rodgers JP, Swanepoel BC and Guthrie AJ. Administration of bovine, porcine and equine growth hormone to the horse: effect on insulin-like growth factor-I and selected IGF binding proteins. *Journal of Endocrinology* (2001) 171, 163-171.
- De Mondenard JP. Dictionnaire du dopage: substances, procédés, conduites, dangers. Edition Masson (2004).
- Dellmann HD, Lue LF and Bellin SI. Fine structural characteristics of neurophysin-positive perivascular plexus that develop in the rat hypothalamus following interruption of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Cell and Tissue Research* (1987)**247**(1): 137-43.
- Donahue C, Kosik K and Shors T. Growth hormone is produced within the hippocampus where its responds to age, sex and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2006)**13**(15): 6031-6036.
- Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* (1998)**78**(3): 745-61.
- Ferguson DC, Katakam P and Hoenig M. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Edited by H. Richard Adams. 7th edition (1995).

- Fronk TJ, Peel CJ, Bauman DE and Gorewit RC. Comparison of different patterns of exogenous growth hormone administration on milk production in Holstein cows. *Journal of Animal Science* (1983)**57**(3): 699-705.
- Fumagalli G and Zanini A. In cow anterior pituitary, growth hormone and prolactin can be packed in separate granules of the same cell. *The Journal of Cell Biology* (1985)**100**: 2019-2024.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe against cancer program, *Leukemia* (2003)**12**: 2318-2357.
- Gaillard O. Hormone de croissance. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée* (2000)**15**: 409-413.
- Ganong W and Jobin M. *Physiologie médicale*. 21th edition (2003).
- Garrel DR, Gaudreau P, Zhang LM, Reeves I and Brazeau P. Chronic administration of growth hormone-releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue. *Journal of Surgical Research* (1991)**51**(4): 297-302.
- Gauthier B. Exploration fonctionnelle de la sécrétion de l'hormone de croissance chez le chien. Thèse de doctorat vétérinaire. Lyon (1991).
- Gerard MP, Hodgson DR, Rose RJ and Walsh WR. Effects of recombinant equine growth hormone on in vitro biomechanical properties of the superficial digital flexor tendon of Standardbred yearlings in training. *Veterinary Surgery* (2005)**34**(3): 253-9.
- Gilpin DA, Barrow RE, Rutan RL, Broemeling L and Herndon DN. Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. *Annals of Surgery* (1994)**220**(1): 19-24.
- Goodman RH, Lund PK, Jacobs JW and Habener JF. Pre-prosomatostatins. Products of cell-free translations of messenger RNAs from anglerfish islets. *The Journal of Biological Chemistry* (1980)**255**(14): 6549-52.
- Greenspan FS, Li Ch et al. Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinology* (1949)**45**(5): 455-63.
- Grobe D, Douthitt R and Zepeda L. A model of consumers' risk perceptions toward recombinant bovine growth hormone (rbGH): the impact of risk characteristics. *Risk Analysis* (1999)**19**(4): 661-673.
- Guillemin R, Brazeau P, Böhlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB, Bloch B, Mougin C, Zeytin F and Baird A. Somatocrinin, the growth hormone releasing factor. *Recent Progress in Hormone Research* (1984)**40**: 233-299.
- Hashimoto S, Fumagalli G, Zanini A, and Meldolesi J. Sorting of three secretory proteins to distinct secretory granules in acidophilic cells of cow anterior pituitary. *The Journal of Cell Biology* (1987)**105**: 1579-1586.

- Hindmarch PC, Matthews DR, Brain CE, Pringle PJ, Di Silvio L, Kurtz AB and Brook CGD. The half-life of exogenous growth hormone after suppression of endogenous growth hormone secretion with somatostatin. *Clinical Endocrinology* (1989)**30**: 443-450.
- Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C and Schwartz J. Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1 and junB through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry* (1998)**273**(47): 31327-36.
- Idelman S and Verdetti J. Endocrinologie et communications cellulaires. EDP Sciences (2000).
- Julen Day TR, Potter GD, Morris EL, Greene LW and Simmons JB. Physiologic and skeletal response to exogenous equine somatotropin (eST) in two-year-old Quarter Horses in race training. *Equine Nutrition and Physiology Society Annual Symposium*, Fort Worth, Texas Mai 28-31 (1997).
- Kicman AT, Miell JP, Teale JD, Powrie J, Wood PJ, Laidler P, Milligan PJ and Cowan DA. Serum IGF-I and IGF binding proteins 2 and 3 as potential markers of doping with human GH. *Clinical Endocrinology* (Oxf)(1997)**47**(1): 43-50.
- Klindt J, Buonomo FC and Yen JT. Administration of porcine somatotropine by sustained-release implant: growth and endocrine responses in genetically lean and obese barrows and gilts. *Journal of Animal Science* (1992)**70**(12): 3721-33.
- Kulinski KM, Thompson DL Jr, Capshaw EL, French DD and Oliver JL. Daily treatment of growing foals with equine somatotropin: pathologic and endocrinologic assessments at necropsy and residual effects in live animals. *Journal of Animal Science* (2002)**80**(2): 392-400.
- Lelandais G. Méthodes bio-informatiques d'analyse des puces à ADN. Laboratoire de Génétique Moléculaire. ENS (2004).
- Lin W. Applications de la technologie des Puces à AND à l'étude de la différenciation méiotique et des mécanismes de recombinaison chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. UMR144 CNRS-Institut Curie, Section de Recherche (2004).
- Machlin LJ. Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science* (1973)**56**(5): 575-80.
- Male D. Immunologie. Aide mémoire illustré. De Boeck Université, Paris (1999).
- Malinowski K, Christensen RA, Hafs HD and Scanes CG: Age and breed differences in thyroid hormones, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF binding proteins in female horses. *Journal of Animal Science* (1996)**74**: 1936-1942.
- Malinowski K, Christensen RA, Konopka A, Scanes CG and Hafs HD. Feed intake, body weight, body condition score, musculature, and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin. *Journal of Animal Science* (1997)**75**: 755-60.
- Martin PGP. Principales techniques de mesure de l'expression des gènes. Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie INRA Toulouse (2007).

- Martineau D. Pathologie du système endocrinien DMV 2220 Département de Microbiologie et Pathologie Faculté de Médecine Vétérinaire Université de Montréal (2003).
- Marx W, Simpson ME and Evans HM. Bioassay of the growth hormone of the anterior pituitary. *Endocrinology* (1942)**30**(1): 1-10.
- Mc Donald's. Veterinary Endocrinology and Reproduction 5th revised edition (2003).
- McKeever, K. H., K. Malinowski, R. A. Christensen, and H. D. Hafs. Chronic recombinant equine somatotropin (eST) administration does not affect aerobic capacity or exercise performance in geriatric mares. *The Veterinary Journal* (1998)**155**: 19–25.
- Moller L, Dalman L, Norrelund H, Billestrup N, Frystyk J, Moller N and Jorgensen JO. Impact of fasting on growth hormone signalling and action in muscle and fat. *Journal of Endocrinology & Metabolism* (2009)**94**(3): 965-72.
- Mulchahey JJ, and Jaffe RB. Detection of a potential progenitor cell in the human fetal pituitary that secretes both growth hormone and prolactin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (1988)**66**: 24-32.
- Nelson JF. The potential role of selected endocrine systems in aging processes. In *Handbook of Physiology, Section 11, Aging*. Edition EJ Masoro, New York: Oxford University Press (1995): 377-394.
- Nikitovitch-Winer MB, Atkin J, and Maley BE. Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female and lactating female rats. *Endocrinology* (1987)**121**: 625-630.
- Papka RE, Yu SM, and Nikitovitch-Winer MB. Use of immunoperoxidase and immunogold methods in studying prolactin secretion and application of immunogold labeling for pituitary hormones and neuropeptides. *The American Journal of Anatomy* (1986)**175**: 289-306.
- Peel CJ, Bauman DE, Gorewit RC and Sniffen CJ. Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows. *Journal of Nutrition* (1981)**111**(9): 1662-71.
- Peronnin P. L'hormone de croissance bovine et ses applications zootechniques. Thèse de doctorat vétérinaire. Alfort (1990).
- Pineau T. Des signatures biologiques contre le dopage équin moderne : utopie ou réalité ? *Equ'Idées* (Revue des Haras Nationaux) (2006).
- Piquemal D. Les nouvelles opportunités et outils de génomique dans la lutte contre le dopage. *Revue Francophone des Laboratoires* (2008)**401**: 61-68.
- Popot MA, Bobin S, Bonnaire Y, Monget P, Toquets MP, Fortier G, Delahaut P and Closset J. Study related to the detection of equine recombinant growth hormone administration in the horse. In *Proceedings of the 13th International Conference of Racing Analysts and Veterinarian*. Cambridge, UK. Eds RB Willians, E Houghton & JF Wade. Newmarket: R&W Publications (2000): 98-104.

- Popot MA, Bobin S, Bonnaire Y, Delahaut PH, Closset J. IGF-I plasma concentrations in non-treated horses and horses administered with methionyl equine somatotropine. *Research in Veterinary Science* (2001)**71**: 167-173.
- Porter TE, Hill JB, Wiles CD and Frawley LS. Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating, and lactating rats. *Endocrinology* (1990)**127**: 2789-2794.
- Rahmanian MS, Thompson DL Jr and Melrose PA. Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the equine pituitary. *Journal of Animal Science* (1997)**75**(11): 3010-8.
- Secchi C and Borromeo V. Structure and function of bovine growth hormone. Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *Journal of Chromatography B* (1997)**688**: 161-177.
- Secchi C, Berrini A, Gaggioli D and Borromeo V. Amino acid modifications in canine, equine and porcine pituitary growth hormones, identified by peptide-mass mapping. *Journal of Chromatography B* (2001)**757**: 237-245.
- Smith LA, Thompson DL Jr, French DD and Leise BS. Effects of recombinant equine somatotropin on wound healing, carbohydrate and lipid metabolism, and endogenous somatotropin responses to secretagogues in gelding. *Journal of Animal Science* (1999)**77**(7): 1815-22.
- Smyth GK and Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods* (2003)**31**(4): 265-73.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* (2004)**3**(1): Article 3.
- Steenfos HH and Jansson JO. Growth hormone stimulates granulation tissue formation and insuline-like growth factor-I gene expression in wound chambers in the rat. *Journal of Endocrinology* (1992)**132**(2): 293-8.
- Stewart F, Goode JA and Allen WR. Growth hormone secretion, in the horse: unusual pattern at birth and pulsatile secretion through to maturity. *Journal of Endocrinology* (1992)**138**: 81-89.
- Stratmann IE, Ezrin C, and Sellers EA. Estrogen-induced transformation of somatotrophs into mammotrophs in the rat. *Cell and Tissue Research* (1974)**152**: 229-238.
- Strobl JS and Thomas MJ. Human growth hormone. *Pharmacological Reviews* (1994)**46**(1): 1-34.
- Thomas MG, Bennett-Wimbush K, Keisler DH and Loch WE. Plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-I in prepuberal quarter horses and ponies. *Journal of Equine Veterinary Science* (1998)**18**(1): 52-55.

- Thompson DL, Rahmanian MS, DePew CL, Burleigh DW, Desouza CJ and Colborn DR. Growth hormone in mares and stallions: pulsatile secretion, response to growth hormone-releasing hormone, and effects of exercise, sexual stimulation, and pharmacological agents. *Journal of Animal Science* (1992)**70**: 2302-1207.
- Van der Velden VH, Brüggemann M, Hoogeveen PG, de Bie M, Hart PG, Raff T et al. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target and stability between diagnosis and relapse, *Leukemia* (2004)**18**: 1971-1980.
- Virlon B, Cheval L, Buhler JM, Billon E, Doucet A and Elalouf JM. Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1999)**96**(26) 15286-15291.
- Zakin MM, Poskus E, Dellacha JM, Paladini AC and Santomé JA. Amino acid sequences around the cystine residues in equine growth hormone. *FEBS Letters* (1972)**25**(1): 77-82.
- Zakin MM, Poskus E, Dellacha JM, Paladini AC and Santomé JA. The amino acid sequence of equine growth hormone. *FEBS Letters* (1973)**34**(2): 353-5.
- Zakin MM, Poskus E, Langton AA, Ferrara P, Santome JA, Dellacha JM, Paladini AC. Primary structure of equine growth hormone. *International Journal of Peptide and Protein Research* (1976)**8**: 435-444.
- Zimmerman, EA, Defendini R, and Frantz AG. Prolactin and growth hormone in patients with pituitary adenomas: A correlative study of hormone in tumor and plasma by immunoperoxidase technique and radioimmunoassay. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (1974)**38**: 577-585.

