

Université de Montréal

**Expression du facteur de transcription SRF chez les  
chevaux atteints de souffle**

par

Karine Guérin-Montpetit

Département de Sciences Cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Août 2013

© Karine Guérin-Montpetit, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression du facteur de transcription SRF chez les chevaux atteints de souffle

Présenté par :  
Karine Guérin-Montpetit

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christine Théoret, présidente-rapporteuse  
Jean-Pierre Lavoie, directeur de recherche  
Mathilde Leclère, membre du jury

## Résumé

Il a été démontré que les chevaux atteints du souffle présentent une augmentation de la masse de muscle lisse entourant les voies respiratoires comparativement à des chevaux sains (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). L'augmentation de la masse de muscle lisse ainsi observée résulte d'une hyperplasie, et possiblement, d'une hypertrophie des myocytes. Les traitements usuels du souffle ne sont que partiellement efficaces à diminuer cette augmentation. L'objectif de cette étude était d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans ces changements affectant la cellule musculaire lisse dans la pathologie du souffle chez le cheval. Pour ce faire, nous avons examiné les effets d'une exposition antigénique sur l'expression du «Serum Response Factor» (SRF) dans le muscle lisse bronchique. Le SRF est un facteur de transcription localisé dans le noyau de la cellule musculaire lisse et régulant l'expression génique de celle-ci en favorisant un phénotype prolifératif ou contractile. Les résultats démontrent qu'avant exposition antigénique, les pourcentages de cellules exprimant le SRF sont faibles. Une augmentation significative du pourcentage de myocytes exprimant le SRF survient suite à une stimulation antigénique chez les chevaux atteints de souffle alors qu'aucune augmentation n'est observée chez les chevaux contrôles. Ces résultats suggèrent que le SRF pourrait contribuer au remodelage du muscle lisse péribronchique dans la pathologie du souffle.

**Mots-clés** : muscle lisse, souffle, remodelage des voies respiratoires, SRF, facteur de transcription

## **Abstract**

Previous studies have shown that heaves-affected horses, when compared to age-matched control horses, have an increased smooth muscle mass surrounding their airways (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Also, it is shown that hyperplasia, and possibly hypertrophy, contribute to this finding. Current therapies are only partially effective at reversing this finding. The goal of this study was to explore the molecular pathways involved in airway smooth muscle remodelling during heaves. We studied the Serum Response Factor (SRF), a nuclear transcriptional factor that controls gene expression in the smooth muscle cell and favour either a proliferative or a contractile phenotype. The results show that before antigenic exposition, the percentage of cells expressing SRF is low. A significant increase in the percentage of SRF-expressing myocytes occurs after antigenic stimulation in heaves-affected horses whereas no increase is observed in control subjects. These results suggest that the transcription factor SRF may contribute to airway smooth muscle remodeling in heaves-affected horses.

**Keywords** : smooth muscle, heaves, airway remodeling, SRF, transcription factor

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements .....	xiii
1. Introduction.....	1
2. Recension des écrits .....	3
2.1 Le souffle .....	3
2.1.1 Définition .....	3
2.1.2 Présentation clinique.....	4
2.1.3 Les facteurs de risque .....	4
2.1.3.1 L'âge .....	4
2.1.3.2 La génétique .....	5
2.1.3.3 La race/le sexe .....	5
2.1.3.4 L'environnement .....	5
2.1.4 La pathogénie .....	6
2.1.4.1 Remodelage pulmonaire .....	7
2.2 Le muscle lisse pulmonaire .....	9
2.2.1 Généralités .....	9
2.2.1.1 Physiologie.....	9
2.2.1.2 Rôle dans un processus inflammatoire .....	12
2.2.1.3 Muscle lisse et souffle.....	13
2.2.2 Facteurs de transcription impliqués dans la modulation phénotypique du muscle lisse.....	14
2.2.2.1 Le "Serum Response Factor" (SRF) .....	14

2.2.2.2 Les autres facteurs et cofacteurs .....	25
3. Méthodologie .....	31
3.1 Animaux .....	31
3.2 Protocole expérimental animal.....	31
3.2.1 Conditions environnementales .....	31
3.2.2 Fonction respiratoire .....	32
3.2.3 Lavage bronchoalvéolaire .....	32
3.2.4 Biopsies de poumon périphérique par thoracoscopie .....	33
3.3 Anticorps.....	33
3.4 Immunobuvardage de Western .....	34
3.5 Immunofluorescence .....	34
3.6 Méthode de récolte des données .....	35
3.7 Technique morphométrique/analyse des images .....	36
3.8 Analyses statistiques.....	37
4. Exposé et analyse des résultats .....	39
4.1 Immunobuvardage de type Western.....	39
4.2 Voies respiratoires périphériques .....	39
4.3 Expression du SRF dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle	42
4.4 Expression du SRF par nombre de cellules dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle .....	44
4.5 Distribution de l'expression du SRF dans les voies respiratoires .....	47
5. Discussion générale.....	51
5.1 Effets de l'exposition antigénique sur l'expression de SRF .....	51
5.2 Implication du SRF dans le souffle .....	53
5.3 Ouverture .....	55
6. Conclusion .....	56
7. Bibliographie .....	57

ANNEXE A.....	xiv
ANNEXE B.....	xvii
ANNEXE C.....	xxx
ANNEXE D.....	xxxiv
ANNEXE E.....	xxxvi

## Liste des tableaux

Tableau I. Facteurs et cofacteurs du muscle lisse .....	25
Tableau II. Nombre de voies analysées par cheval à chacun des temps .....	40
Tableau III. Nombre de voies analysées par groupe à chacun des temps .....	40



## Liste des figures

Figure 1. Tracé de la membrane basale de l'épithélium d'une voie respiratoire.....	37
Figure 2. Immunobuvardage de type Western pour le SRF équin .....	39
Figure 3. Voie respiratoire périphérique de cheval atteint de souffle.....	41
Figure 4. Pourcentage de myocytes bronchiques exprimant le SRF chez les chevaux contrôles et ceux atteints de souffle avant et après stimulation antigénique .....	43
Figure 5. Nombre de cellules exprimant le SRF dans les myocytes bronchiques chez les chevaux contrôle et ceux atteints de souffle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré.....	45
Figure 6. Nombre de cellules exprimant le SRF dans les myocytes bronchiques dans les deux groupes tous temps confondus, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré.....	46
Figure 7. Distribution, selon la taille des voies respiratoires, du pourcentage de cellules musculaires lisses exprimant le SRF chez les chevaux contrôles .....	48
Figure 8. Distribution, selon la taille des voies respiratoires, du pourcentage de cellules musculaires lisses exprimant le SRF chez les chevaux atteints de souffle.....	48
Figure 9. Distribution du nombre de cellules de muscle lisse bronchique exprimant le SRF chez les chevaux contrôle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré. ....	49
Figure 10. Graphique de la distribution du nombre de cellules de muscle lisse exprimant le SRF chez les chevaux atteints de souffle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré. ....	50

## Liste des abréviations

CArG box : Séquences CC(A/T)<sub>6</sub>GG

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

Crp : Protéines LIM riches en cystéines

DAPI : 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

ETS : E-Twenty Six

GTPase : Guanosine triphosphatase

IFN- $\gamma$  : Interféron gamma

LBA : Lavage BronchoAlvéolaire

LPA : Acide lysophosphatidic

LPS : Lipopolysaccharide

MADS-box : Facteurs de transcription MCM1, Agamous, Deficiens et SRF

MCP : Monocyte chemoattractant protein

MPOC : Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique

MRTF : Facteurs de Transcription Reliés à la Myocardine

NID : Net Inhibitory Domain

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

RAO : Recurrent Airway Obstruction

SAP : SAF-A, Acinus, PIAS

SMA :  $\alpha$ -actin du muscle lisse

SRE : Élément de Réponse du Sérum

SRF : Serum Response Factor

TAD : Domaine d'Activation de la Transcription ou Domaine de Trans-Activation

TCF : Facteurs de Complexe Tertiaire

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

*À ma mère, Johanne Guérin et mon père,  
Michel Montpetit*

## Remerciements

À Dr Jean-Pierre Lavoie,

Professeur à l'Université de Montréal, pour son soutien et ses conseils, qui m'ont guidée à travers les années qui ont mené à cette thèse. Je le remercie pour la patience dont il a fait preuve lors des innombrables heures consacrées à la correction et relecture de ce mémoire. Je tiens également à souligner ses qualités humaines d'écoute et de compréhension qui ont été grandement appréciées.

À Dre Christine Théoret et Dre Mathilde Leclère,

Pour avoir accepté de faire part du jury d'évaluation.

À Dre Mathilde Leclère, Josiane Lefebvre-Lavoie, Anouk Lavoie-Lamoureux, Guy Beauchamp, Émilie Setlakwe, Émilie Gélinas-Lymburner et les autres membres du laboratoire,

Pour leur aide lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je les remercie d'avoir si généreusement et patiemment partagé leurs connaissances biochimiques, électroniques, statistiques et autres. Ce mémoire ne serait pas complet sans leurs conseils et leurs multiples explications. Un gros merci.

Aux chevaux de la ferme Frontenac,

Sans qui tout ce projet n'aurait eu lieu.

À ma famille et mes amis, ma sœur et mon frère,

Qui ont su me faire rire quand rien ne le pouvait. Qui ont été un appui, une source de réconfort et une présence tout au long de cette maîtrise.

À mes parents,

Pour leur soutien dans les bons et mauvais moments et pour leur amour inconditionnel. Ils sont pour moi une source d'inspiration, de volonté et de fierté qui me pousse à l'excellence. Sans eux, sans leur confiance, cette aventure ne serait jamais survenue. Merci à vous.

# 1. Introduction

Le souffle chez le cheval est une pathologie qui est similaire en certains points à l'asthme chez l'humain. Ce sont deux pathologies inflammatoires impliquant les voies respiratoires inférieures et qui sont caractérisées par une hyperréactivité des bronches et une obstruction bronchique réversible (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Cette maladie du cheval sert donc de modèle pour l'étude de l'asthme humain. Dans le souffle, les voies respiratoires subissent un remodelage tissulaire ayant un impact sur la fonction respiratoire. Il est caractérisé par une hyperplasie des cellules à mucus, une augmentation de la masse de muscle lisse bronchique et une modification de la matrice extracellulaire (Kaup, Drommer et al. 1990, Bartner, Robinson et al. 2006, Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006).

Le muscle lisse bronchique joue un rôle important dans la pathologie. Non seulement contribue-t-il à l'obstruction mécanique en contrôlant le diamètre des voies respiratoires, mais les myocytes pourraient aussi participer à la réponse inflammatoire qui survient lors d'exposition antigénique. En effet, les myocytes auraient des fonctions proinflammatoires et immunomodulatrices (Ozier, Allard et al. 2011). Il a donc été postulé que le remodelage du muscle lisse est une conséquence de l'inflammation, en partie perpétué par les myocytes eux-mêmes. Présentement, les corticostéroïdes sont utilisés pour traiter les crises de souffle et visent à contrôler la réaction inflammatoire. Une étude récente (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2012) a déterminé que ce traitement ne produit qu'une réversibilité partielle de l'augmentation de la masse de muscle lisse. La compréhension des mécanismes par lesquels le remodelage du muscle lisse survient offrirait de nouvelles options pour la thérapie. Ainsi, l'objectif de l'étude est d'identifier certains mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage du muscle lisse observé dans le souffle. Le «Serum response factor» (SRF) est un facteur de transcription régulant différents gènes associés avec la croissance et la différenciation cellulaire, avec le développement et la fonction musculaire et avec la fonction neuronale. Son activité devient spécifique par, entre

autres, la liaison à divers cofacteurs (Chai and Tarnawski 2002). Dans la cellule musculaire lisse, le SRF détermine le phénotype prolifératif ou différencié de la cellule.

L'hypothèse de cette thèse est donc la suivante : le SRF est un facteur de transcription contribuant au processus de remodelage du muscle lisse bronchique chez les chevaux atteints de souffle. Pour tester cette hypothèse, des chevaux atteints de souffle et des chevaux contrôles, soit des chevaux sains et exempt de toute maladie pulmonaire, ont été exposés à du foin de pauvre qualité, afin d'induire l'exacerbation de la maladie chez les chevaux susceptibles. Des échantillons de tissus pulmonaires ont été récoltés avant et après l'exposition dans le but de déterminer la présence du SRF par immunofluorescence sur le muscle lisse péribronchique.



## **2. Recension des écrits**

### **2.1 Le souffle**

#### **2.1.1 Définition**

Le souffle est une pathologie caractérisée par une inflammation des voies respiratoires inférieures accompagnée d'une hyperréactivité des bronches et d'une obstruction réversible des voies respiratoires (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Les chevaux atteints sont généralement hypersensibles aux antigènes inhalés, qui sont, d'ailleurs, un élément déclencheur des crises de souffle.

Cette maladie est observée plus fréquemment chez les chevaux de l'hémisphère nord comparativement aux chevaux vivant dans un climat plus chaud et sec (Robinson, Derksen et al. 1996). Cette particularité peut être expliquée par le fait que, dans les endroits à climat froid, les chevaux vivent une bonne partie de l'année dans une écurie en raison du climat hivernal. L'alimentation de ces chevaux avec du foin de pauvre qualité contribue aussi à la maladie. Une mauvaise ventilation de l'écurie contribue à l'augmentation de la poussière et les allergènes provenant du foin dans l'environnement de l'animal.

Le terme «maladie pulmonaire obstructive chronique» (MPOC) du cheval (chronic obstructive pulmonary disease (COPD) en anglais) a été introduit pour la première fois en 1971 par Sasse et qualifiait une inflammation et une obstruction des voies respiratoires chez le cheval mature (Sasse 1971). Cependant, étant donné la dissemblance du MPOC chez le cheval et chez l'humain, ce terme n'est pas adéquat pour désigner la maladie. En effet, le

souffle est beaucoup plus semblable à l'asthme chez l'humain. Ainsi, en 2000, à l'occasion de l'*International Workshop on Equine Chronic Airway Disease*, il a été décidé que «RAO» (recurrent airway obstruction) ou «heaves» qualifierait la maladie dans laquelle il y a une inflammation des voies respiratoires inférieures accompagnée d'une obstruction réversible de ces voies et d'une hyperréactivité des bronches (Robinson 2001).

## **2.1.2 Présentation clinique**

Une détresse respiratoire au repos est le signe clinique qui par définition doit être présent chez le cheval atteint de souffle. L'animal peut aussi présenter une intolérance à l'exercice et une toux récurrente, qui peut être paroxysmale et associée à de la flatulence (Robinson 2001). La détresse respiratoire se caractérise par un cou étendu, les naseaux dilatés et de grands mouvements respiratoires avec participation accrue des muscles abdominaux à l'expiration (Leguillette 2003). Une augmentation des signes d'obstruction respiratoire peut aussi être observée lorsque le cheval atteint est placé dans un environnement riche en antigènes en suspension dans l'air.

## **2.1.3 Les facteurs de risque**

### **2.1.3.1 L'âge**

De manière générale, ce sont surtout des chevaux matures, d'au moins 7 ans d'âge, qui sont atteints de la maladie (Couetil and Ward 2003, Hotchkiss, Reid et al. 2007). Étant donné le caractère chronique de la maladie et le fait que ce soit surtout des animaux âgés qui sont atteints, des altérations du parenchyme pulmonaire (remodelage progressif) pourraient contribuer à la progression de la maladie.

### **2.1.3.2 La génétique**

Il existe une prévalence élevée de la maladie au sein de certaines familles de chevaux. Ce phénomène porte à croire qu'il s'agirait d'une maladie héréditaire, bien qu'une composante génétique n'a pas encore été défini avec certitude (Gerber, Baleri et al. 2009). D'ailleurs, des polymorphismes de gènes spécifiques ont été identifiés dans une famille par l'entremise du récepteur de l'interleukine 4 (IL4RA) (Klukowska-Rotzler, Swinburne et al. 2012). Le gène de ce récepteur possède un rôle dans le développement de l'asthme humain (Jost, Klukowska-Rotzler et al. 2007). De multiples variantes de ce gène ont été démontrées chez deux étalons et leur descendance, atteints de souffle.

### **2.1.3.3 La race/le sexe**

Aucune prédisposition de race ou de sexe n'a pu être mise en évidence.

### **2.1.3.4 L'environnement**

Il existe une association entre certains facteurs et le déclenchement de crise de souffle. L'air dans une écurie contient quantité de particules variées, tels que moisissures, bactéries, mites, débris de plantes et composés inorganiques, et de gaz ayant le potentiel de provoquer une réaction lorsqu'ils parviennent au tractus respiratoire. L'inhalation expérimentale d'extraits de *Aspergillus fumigatus* et de *Faenia rectivirgula*, des espèces typiquement retrouvées dans le foin de piètre qualité (Woods, Robinson et al. 1993), a produit une réponse inflammatoire de type neutrophilique chez les chevaux atteints de souffle (McPherson, Lawson et al. 1979, Derksen, Robinson et al. 1988). Également, il a été démontré que la poussière dans l'air d'une étable peut contenir des endotoxines en quantité suffisante pour produire une réaction inflammatoire de type neutrophilique au sein du tissu pulmonaire (McGorum, Ellison et al. 1998). Cependant, les endotoxines seules ne produisent pas une réaction inflammatoire dans le poumon aussi forte que lorsque combinées à un

extrait de moisissure (Pirie, Dixon et al. 2003). Ces antigènes pris séparément produisent une réponse inflammatoire de type neutrophilique chez les chevaux atteints de souffle qui est inférieure en sévérité à la réponse observée chez les chevaux exposés à du foin moisi. Une étude (Hotchkiss, Reid et al. 2007) a également déterminé que les chevaux hébergés dans un environnement urbain sont plus à risque d'être atteint de souffle que les chevaux en milieux ruraux. Une exposition à des quantités élevées de polluants et une régie différente, conséquence d'un style de vie urbain, pourraient être en cause.

#### **2.1.4 La pathogénie**

Les neutrophiles sont recrutés tôt suivant une exposition antigénique (Marr, Lees et al. 2002) et infiltrent les parois des bronches relâchant un ensemble de médiateurs contribuant, entre autres, à la réaction inflammatoire et au recrutement des autres populations cellulaires (mastocytes, basophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles) (van der Haegen, Kunzle et al. 2005). Les chevaux atteints de souffle présentent une plus grande quantité de neutrophiles dans leur lavage bronchoalvéolaire (LBA) que des chevaux contrôles et ces neutrophiles sont activés (Marr, Foster et al. 1997, Franchini, Gilli et al. 1998, Franchini, Gill et al. 2000). Les neutrophiles peuvent produire et sécréter une grande quantité de médiateurs de l'inflammation et de molécules chimiotactiques d'où l'importance imputée à cette cellule et aux dommages qu'elle pourrait produire dans le poumon. Toutefois, la contribution du neutrophile à la pathophysiologie du souffle, bien que fortement suspectée, n'a pas été clairement démontrée.

Les lymphocytes T agissent dans la modulation de la réponse allergique retardée et dans la neutrophilie tissulaire (Li, Zhang et al. 2012). Des études suggèrent une implication des lymphocytes de type Th2 dans la

pathologie du souffle, tel que démontré par une expression accrue de l'IL-4 et l'IL-5 dans le LBA de chevaux affectés (Lavoie, Maghni et al. 2001). Une diminution de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), cytokine associée à un phénotype Th1, a également pu être observée par hybridation *in situ* dans les mêmes études. D'autres ont plutôt démontré un mélange des deux phénotypes ou une prédominance du phénotype Th1 (Giguere, Viel et al. 2002, Ainsworth, Grunig et al. 2003). Ces contradictions apparentes indiquent la complexité de la réponse inflammatoire survenant localement au niveau du poumon, ainsi que l'importance d'études supplémentaires pour comprendre les mécanismes en cause.

## **2.1.4.1 Remodelage pulmonaire**

### **2.1.4.1.1 Processus**

On considère que le remodelage pulmonaire est la résultante de l'inflammation chronique affectant les voies respiratoires suite à des crises consécutives de souffle. Les changements observés dans le tissu pulmonaire découleraient de l'action des médiateurs relâchés par les cellules inflammatoires sur les différentes populations cellulaires des voies respiratoires. L'épaississement de la paroi des voies respiratoires causerait le rétrécissement de leur lumière et, ainsi mènerait à une obstruction du passage de l'air (Robinson, Derksen et al. 1996).

### **2.1.4.1.2 Changements**

#### *Cellules épithéliales :*

Les cellules épithéliales tiennent le rôle de barrière physique entre le système et le milieu extérieur. Chez les chevaux atteints de souffle, les cellules de Clara, cellules non-ciliées avec granules cytoplasmiques se trouvant principalement au niveau des voies

respiratoires périphériques, présentent une perte de granulation sans métaplasie ou production de mucus (Katavolos, Ackerley et al. 2009). Une hyperplasie et métaplasie des cellules à gobelet, cellules sécrétant le mucus, a également été observée (Range, Mundhenk et al. 2007). En conséquence, les chevaux atteints de souffle produisent une plus grande quantité de mucus comparativement à des chevaux sains en réponse à une exposition au foin (Gerber, Lindberg et al. 2004). Ainsi, le surplus de mucus contribue à l'obstruction de la lumière des voies respiratoires.

#### *Cellules musculaires lisses :*

Lors de souffle, les médiateurs relâchés par les cellules inflammatoires agissent sur le muscle lisse entourant les voies respiratoires et provoquent un bronchospasme directement ou via la relâche d'acétylcholine. Cette diminution du diamètre interne des voies respiratoires produit l'obstruction partielle de ces voies caractéristique de la maladie (Robinson, Derksen et al. 1996). Les médiateurs pro-inflammatoires vont aussi stimuler la relâche de cytokines et de chimiokines par les cellules musculaires lisses et contribuent à maintenir cette contraction (Ozier, Allard et al. 2011). De plus, il a été démontré que les chevaux atteints de souffle présentent une augmentation de la masse de muscle lisse des voies respiratoires (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Cette augmentation contribuerait à l'obstruction des voies respiratoires de manière passive et active. En effet, l'augmentation de la quantité de muscle lisse cause un rétrécissement de la voie en augmentant l'épaisseur des parois bronchiques et aussi une augmentation de la force de bronchoconstriction (James, Pare et al. 1989, Wiggs, Moreno et al. 1990).

### *Matrice extracellulaire :*

Elle est composée d'un ensemble de protéines formant un réseau qui fournit un support structurel, permet la compartimentalisation et sert de barrière au parenchyme pulmonaire. Les chevaux atteints de souffle présentent des changements dans la région sous-épithéliale de leurs voies respiratoires tel qu'observé dans l'asthme chez l'humain (Bai and Knight 2005, Lanctot Setlakwe 2011), ce qui a le potentiel d'influencer le muscle lisse bronchique. En effet, le réseau de molécules que forme la matrice extracellulaire entoure complètement le muscle lisse jouant ainsi un rôle important dans la modulation de ses propriétés (Black, Roth et al. 2001). Une étude récente utilisant une méthode morphométrique (Lanctot Setlakwe 2011) a démontré que la région sous-épithéliale des voies respiratoires des chevaux atteints de souffle présente une augmentation de collagène comparativement aux voies respiratoires de chevaux contrôle. De plus, cette fibrose semble être un processus chronique étant donné qu'une stimulation antigénique de trente jours n'a pas entraîné de changement à ce niveau. Toutefois, une étude semi-quantitative (Furness, Bienzle et al. 2010) a montré que, bien que le collagène I et III est également présent dans les bronches non cartilagineuses des chevaux, aucune différence entre les chevaux contrôle et les chevaux atteints de souffle n'a été observée.

## **2.2 Le muscle lisse pulmonaire**

### **2.2.1 Généralités**

#### **2.2.1.1 Physiologie**

Le muscle lisse, contrairement au muscle cardiaque et au muscle squelettique, est dépourvu de stries à sa surface. Les filaments d'actine et

de myosine ne sont pas disposés parallèlement; ils adoptent plutôt une disposition spiralée (Campbell and Reece 2004) ou «irrégulière» (Wheater, Young et al. 2001). De plus, comparé aux cellules du muscle strié, les cellules musculaires lisses contiennent moins de myosine (Cunningham and Klein 2007), n'ont pas de système de tubules transverses et leur réticulum sarcoplasmique est moins développé. Grâce à sa structure particulière, le muscle lisse peut s'étirer davantage et se contracter beaucoup plus longtemps que le muscle squelettique. Ce faisant, il consomme moins d'énergie que le muscle squelettique, résistant plus longtemps à la fatigue. La cellule musculaire lisse, lorsqu'elle n'est pas contractée, adopte une forme mince et allongée. Elle ne possède qu'un seul noyau (Wheater, Young et al. 2001).

Dans les poumons, on retrouve le muscle lisse depuis la trachée jusqu'aux bronches terminales. Son importance fonctionnelle augmente à mesure que le diamètre interne de la voie rétrécie. En effet, selon la loi de Poiseuille, si le diamètre de la voie respiratoire diminue de moitié, la résistance dans cette même voie est augmentée de 16 fois (West 1985). Ce phénomène souligne l'importance du muscle bronchique au niveau des voies respiratoires durant la respiration.

Divers processus physiologiques gouvernent l'état de contraction et relaxation de la cellule musculaire lisse dans le poumon. La contraction du muscle lisse pulmonaire est contrôlée par le système nerveux sympathique, les hormones circulantes et les médiateurs locaux (Wheater, Young et al. 2001). Le système nerveux autonome contrôle la constriction et la relaxation du muscle lisse bronchique. Le nerf vague fournit la stimulation parasympathique (Cunningham and Klein 2007), provoquant une contraction du muscle lisse et une bronchoconstriction. Un irritant



aérien peut, en stimulant les récepteurs appelés « irritant receptors » situés dans l'arbre trachéobronchique, activer le système parasympathique causant une bronchoconstriction réflexe (Cunningham and Klein 2007). La bronchodilatation est surtout régie par le système sympathique, lequel possède un nombre restreint de nerfs parvenant au muscle lisse des voies respiratoires (Warren, Jennings et al. 1984). Les agonistes des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques, tel que les catécholamines relâchées en circulation par la médulla surrénale vont occasionner une relaxation du muscle (Antonelli, Torchio et al. 2012). Les systèmes nerveux non-adrénergique non-cholinergique inhibitoire (iNANC) et excitatoire (eNANC) contribuent aussi à la modulation de l'état de contraction du muscle lisse bronchique (Matera, Amorena et al. 2002).

Le muscle lisse pulmonaire conserve une certaine plasticité phénotypique et fonctionnelle (Chung 2008). En effet, une cellule musculaire lisse différenciée peut adopter un phénotype sécrétoire ou contractile *in vitro*. Ce dernier processus est marqué par l'apparition de l'appareil contractile et de ses protéines, la capacité à répondre à des agonistes contractiles physiologiques et une diminution des organelles synthétiques. Les marqueurs du phénotype contractile sont l' $\alpha$ -actin du muscle lisse, la  $\gamma$ -actin du muscle lisse, la «myosin heavy chain» du muscle lisse, la calponin, la h-caldesmon, le SM22, la desmin, le caveolin-1 et le «smoothelin» (Chung 2008). Les cellules musculaires lisses participent activement à la réponse inflammatoire *in vivo* survenant dans la paroi bronchique en synthétisant et sécrétant des chimiokines, facteurs de croissance et autres molécules pro-inflammatoires en réponse à un ensemble de stimuli. Cette fonction sécrétoire (également nommée synthétique) inclut un large éventail de molécules contribuant au remodelage de la cellule et de son milieu. Elle participerait, par le fait

même, à maintenir un environnement inflammatoire dans les parois bronchiques chez les individus atteints d'asthme.

La cellule musculaire lisse possède également la capacité de proliférer en réponse à des stimuli tels que facteurs de croissance (facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)) ou protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine) (Dekkers, Schaafsma et al. 2007). Lors de la prolifération, le myocyte perd sa fonction contractile au profit d'un phénotype dit synthétique dans lequel des organelles de synthèse pour les protéines et lipides, ainsi que des mitochondries s'accumulent dans la cellule (Mitchell, Halayko et al. 2000). Cet état est réversible et se produit lors de la maturation cellulaire. Ce processus est marqué par l'acquisition de l'appareil contractile et ses protéines associées, ainsi que la perte des organelles de synthèse (Mitchell, Halayko et al. 2000). Ces phénomènes sont observés *in vitro*, les mécanismes survenant *in vivo* sont peu documentés.

#### **2.2.1.2 Rôle dans un processus inflammatoire**

Lors de réaction inflammatoire, la cellule musculaire lisse pourra également sécréter des cytokines, des chimiokines et autres médiateurs de l'inflammation (par exemple IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, «monocyte chemoattractant protein» (MCP)-1, MCP-2, MCP-3, eotaxine, facteur d'inhibition de la leucémie, prostanoïdes) (Chung 2008). Cette sécrétion est induite, entre autre, par des cytokines pro-inflammatoires. La cellule musculaire lisse possède en effet en surface des récepteurs de cytokines et de chimiokines (Chung 2008).

La cellule musculaire lisse aurait également une fonction immunitaire. En effet, elle peut lier certaines cellules immunitaires et exprime le

complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II), les récepteurs CD80, CD86, CD44, CD40 et le ligand OX40, ces derniers jouant un rôle dans le développement de l'immunité (Chung 2008).

### **2.2.1.3 Muscle lisse et souffle**

Tout comme dans l'asthme chez l'humain, le muscle lisse dans le souffle est dysfonctionnel (Yu, Wang et al. 1994) ce qui contribuerait à l'hyperréactivité non-spécifique observée (James, Pare et al. 1989). Le remodelage du muscle lisse bronchique avec augmentation de la masse a été démontré chez l'humain, mais le processus inflammatoire conduisant et maintenant cet état est mal compris. Des études portant sur l'asthme soutiennent qu'il y a évidence d'hyperplasie et d'hypertrophie du muscle lisse dans les voies respiratoires chez les sujets atteints (Benayoun, Druilhe et al. 2003, Munakata 2006, Ozier, Allard et al. 2011, James, Elliot et al. 2012).

Dans une étude menée par Herszberg, Ramos-Barbon et al. (2006), les chevaux atteints de souffle présentent une augmentation de l'ordre de 2,8 fois la masse de muscle lisse bronchique comparativement à des chevaux sains, associée à une hyperplasie et de l'apoptose des myocytes bronchiques. Cette hyperplasie est suggérée par la détection de marqueurs de prolifération en plus grande quantité au niveau des noyaux des myocytes bronchiques. Le rôle de l'apoptose dans l'augmentation de la masse de muscle lisse pourrait indiquer un mécanisme de compensation pour la croissance hyperplasique des cellules musculaires lisses.

Dans une autre étude, des chevaux atteints de souffle présentent une augmentation de la masse de muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires périphériques, sans que celle-ci soit affectée par une

exposition antigénique de 30 jours (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Une hyperplasie, et possiblement une hypertrophie, des cellules musculaires lisses contribueraient à ce phénomène. Le maintien de la masse de muscle lisse bronchique chez les chevaux atteints serait une conséquence de l'augmentation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire observée. Les chevaux contrôles présentent également une neutrophilie pulmonaire et une augmentation dans le turnover cellulaire des myocytes suite à une exposition antigénique, mais sans évidence de remodelage des voies respiratoires (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011).

Par leur capacité à produire un ensemble de médiateurs pro-inflammatoires, chimiokines et facteurs de croissance, les cellules musculaires lisses bronchiques pourraient jouer un rôle dans l'enclenchement du remodelage et le maintien d'un milieu inflammatoire dans la paroi bronchique. Ce faisant, les cellules musculaires lisses participeraient au processus pathologique de l'asthme (Chung 2008). Étant donné que l'hyperplasie du muscle lisse bronchique est associée à des conséquences fonctionnelles et mécaniques, une exploration des mécanismes impliqués dans cette augmentation est requise.

## **2.2.2 Facteurs de transcription impliqués dans la modulation phénotypique du muscle lisse**

### **2.2.2.1 Le "Serum Response Factor" (SRF)**

#### **2.2.2.1.1 Généralités**

Le SRF est un facteur de transcription des gènes du muscle lisse retrouvé notamment dans les cellules du muscle bronchique. À l'aide de cofacteurs, le SRF

permet l'expression spécifique de gènes produisant un phénotype contractile ou prolifératif de la cellule musculaire lisse.

### *Structure*

Le SRF est une protéine de 508 acides aminés et de 67 kDa de poids moléculaire. Son gène possède 7 exons et peut subir un épissage alternatif. Elle est composée de trois portions ou domaines majeurs, soit un domaine se liant à l'ADN, un domaine de trans-activation et une portion contenant des sites de phosphorylation (Chai and Tarnawski 2002).

Les SRF fait partie de la famille des facteurs de transcription MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS et SRF (MADS)-box (Chai and Tarnawski 2002) se retrouvant chez les animaux et les champignons. Ces facteurs ont en commun une région de 56-60 acides aminés appelée MADS-box (Wu, Huang et al. 2011). Cette région est hautement conservée parmi les eucaryotes (Chai and Tarnawski 2002). Le MADS-box, se situant dans la portion N-terminale de la protéine, permet l'homodimérisation et la liaison spécifique à l'ADN (Pipes, Creemers et al. 2006). Le SRF homodimère se lie à des séquences  $CC(A/T)_6GG$ , aussi appelées séquences  $CC(A/T)_6GG$  (CArG box) ou élément de réponse du sérum (SRE) (Wang and Olson 2004). Les gènes SRF-dépendants du muscle lisse contiennent presque tous au moins deux régions nommées CArG box, ou SRE, qui permettent, entre autres, la liaison du SRF au promoteur (Pipes, Creemers et al. 2006). Ces CArG box se trouvent dans la région régulatrice des gènes, le promoteur, qui peut être activé par le facteur de transcription (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003).

Le domaine d'activation de la transcription, ou domaine de trans-activation (TAD), se situe à la portion C-terminale de la protéine (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003). Selon Gauthier-Rouviere, Cavadore et al. (1991), il serait possible que le domaine de liaison de l'ADN (MADS box) affecte négativement le TAD. Ce serait par l'action de facteurs de transcription, de cofacteurs, de corépresseurs et de facteurs architecturaux que cette inhibition est levée et facilite l'action du SRF sur le gène (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003).

Le SRF possède différents sites de phosphorylation. Leur rôle et implication dans la fonction de la protéine restent sujets à débat (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003). En fait, la phosphorylation de certains sites particuliers engendrerait une action précise. Par exemple, la phosphorylation du Ser<sup>103</sup> sur le SRF a été associée avec l'expression de c-fos (gène de croissance). Par contre, la délétion de ce site n'a pas produit de conséquence sur l'activation de l'expression de c-fos (Drewett, Devitt et al. 2001). Donc des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer la fonction structurelle du SRF.

Chez la souris, quatre isoformes ARN de SRF ont été découverts. (Kemp and Metcalfe 2000). Ils se retrouvent dans différents types tissulaires et auraient des fonctions différentes. L'isoforme SRF-L possède les 7 exons et correspond au SRF humain. L'isoforme SRF-M (SRF $\Delta$ 5) ne possède pas l'exon 5 et interfère dans la transcription des gènes SRF-dépendants (Chai and Tarnawski 2002). Cet isoforme se retrouve dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux et dans les cellules musculaires striées, tout comme le SRF-L (Kemp and Metcalfe 2000). L'isoforme SRF-S a seulement été retrouvé dans l'aorte et ne possède ni l'exon 5, ni l'exon 4. L'isoforme SRF-I, qui ne possède pas

les exons 3, 4 et 5, a été retrouvé que dans les tissus embryonnaires (Chai and Tarnawski 2002). Ces isoformes jouent des rôles bien définis dans les processus pathologiques et dans la régulation de la fonction du SRF.

### *Localisation*

Le SRF est exprimé tôt durant l'embryogenèse dans les cellules musculaires cardiaques, striées et lisses (Croissant, Kim et al. 1996). Le SRF actif se localise dans le noyau de la cellule (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003). Il semble y avoir une méthode de régulation de l'activité du SRF par la translocation de la protéine du noyau au cytoplasme. Cette translocation semble être impliquée dans le processus embryonnaire et celui de la différenciation cellulaire. En effet, il a été déterminé par buvardage de Western et immunohistochimie que l'expression intranucléaire de SRF diminuait lorsque la cellule souche mésenchymateuse se différenciait en adipocyte (Ding, Gao et al. 2001). Ces résultats portent à croire que la localisation intracellulaire du SRF varie selon le type de cellule et le stade de développement de celle-ci.

#### **2.2.2.1.2 Voies d'activation et de régulation du SRF**

Les différentes actions du SRF sont régulées par un ensemble de voies de signalisation intervenant soit directement sur le SRF, soit sur ses cofacteurs. Le SRF active la prolifération ou la différenciation de la cellule musculaire lisse en s'associant avec différents cofacteurs, ce qui définira l'état phénotypique de la cellule (Pipes, Creemers et al. 2006). Comme mentionné précédemment, il existe d'autres mécanismes de régulation du SRF. Parmi les mécanismes de régulation du SRF mentionnons la phosphorylation, l'épissage alternatif et la translocation nucléaire.

Tout d'abord, la liaison du SRF avec le facteur de complexe tertiaire ELK-1, un cofacteur, engendre un phénotype prolifératif chez la cellule tandis que la liaison du SRF avec la myocardine engendre un phénotype différencié ou contractile (Li, Wang et al. 2003, Buchwalter, Gross et al. 2004, Zhou, Hu et al. 2005, Pipes, Creemers et al. 2006, Boros, Donaldson et al. 2009).

Ensuite, la voie de signalisation du Rho est aussi impliquée dans divers aspects des activités du SRF. Une des protéines de cette voie, la protéine RhoA, une guanosine triphosphatase (GTPase), se trouve en grande quantité dans les cellules indifférenciées (Jakkaraju, Zhe et al. 2003). Pour permettre la différenciation cellulaire, le RhoA est inhibé et la cellule change de forme (Badri, Zhou et al. 2008). L'élongation de la cellule permet le transport du SRF au noyau et le SRF $\Delta$ 5 n'est plus produit. Le tout permet le développement du muscle lisse (Jakkaraju, Zhe et al. 2003).

Le SRF possède plusieurs sites de phosphorylation ce qui permet la régulation de ses activités. Ainsi, la phosphorylation du SRF augmente sa capacité à lier l'ADN en modifiant ce site de liaison. Il se pourrait aussi que la phosphorylation d'autres sites affecte la vitesse d'association et de dissociation du SRF sans affecter sa capacité de liaison à l'ADN. L'impact de la phosphorylation sur l'activité du SRF n'est pas encore complètement compris (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003).

L'épissage alternatif est une autre méthode de régulation du SRF. En effet, il produit des protéines ne possédant pas certains domaines, donc certaines fonctions du SRF. Tel est le cas avec le SRF $\Delta$ 5. Cet isoforme



est exprimé à de hauts niveaux dans les cellules embryonnaires. Il ne possède pas l'exon 5 et interfère avec l'expression des gènes du muscle lisse. Il agit donc comme une forme dominante négative du SRF qui empêche la différenciation cellulaire. La même chose se produit avec l'isoforme SRF $\Delta$ 4 exempt de l'exon 4. La portée de cette méthode de régulation n'a pas encore été explorée (Chai and Tarnawski 2002, Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003).

Finalement, la translocation nucléo-cytoplasmique du SRF par l'intermédiaire du PKA représente un autre moyen de réguler l'activité de ce facteur (Camoretti-Mercado, Dulin et al. 2003). Ce processus est dynamique et dépend de la cellule et de son stade de développement. Par exemple, la différenciation de cellules mésenchymateuses en adipocytes inactive la capacité du SRF à lier l'ADN et ce dernier se retrouve dans le cytoplasme (Ding, Gao et al. 2001). Dans le système respiratoire, la localisation nucléaire du SRF est déclenchée par l'élongation de la cellule et est maintenue dans la cellule différenciée puisque le SRF y est nécessaire pour exprimer des gènes spécifiques du muscle lisse (Yang, Beqaj et al. 2000).

Ces voies de signalisation sont stimulées par un ensemble de signaux externes. Ainsi, le SRF peut être activé *in vitro* par le sérum, l'acide lysophosphatidic (LPA), les mitogènes, le lipopolysaccharide (LPS), les cytokines, le «tumor necrosis factor» (TNF $\alpha$ ), les oncogènes activés, les antioxydants et la lumière UV pour n'en nommer que quelques-uns (Chai and Tarnawski 2002).

### **2.2.2.1.3 Rôle physiologique et fonctionnel**

Le SRF est un régulateur important de différents gènes associés avec la croissance et la différenciation cellulaire, avec le développement et la fonction musculaire, et avec la fonction neuronale (Chai and Tarnawski 2002). L'étude de son processus d'action est essentielle à la compréhension de plusieurs pathologies.

#### *Au niveau de la cellule mésenchymateuse de l'embryon*

L'expression du SRF dans l'embryogenèse est restreinte aux futures lignées de cellules musculaires. Le SRF permet la différenciation de la cellule mésenchymateuse du poumon en cellule musculaire lisse bronchique. Une première théorie suggère que, lors du développement embryonnaire, le contact des cellules épithéliales et mésenchymateuses stimule la formation d'un composant de la membrane basale, la laminin-1 (Badri, Zhou et al. 2008). La cellule mésenchymateuse change alors de conformation pour adopter une forme plus allongée. L'élongation de la cellule est essentielle à la différenciation des cellules mésenchymateuses indifférenciées en cellules myogéniques. Ce changement de forme stimule l'expression d'un autre composant de la matrice extracellulaire, la laminin-2, et supprime la synthèse de SRF $\Delta$ 5 au profit du SRF. Le SRF peut alors faciliter la myogenèse (Jakkaraju, Zhe et al. 2003) (Badri, Zhou et al. 2008).

Une autre théorie suggère que la formation du tissu musculaire bronchique est dépendante de la pression intraluminaire. En effet, (Yang, Beqaj et al. 2000) ont démontré qu'un étirement mécanique des cellules musculaires en devenir au niveau des voies respiratoires stimule l'expression des protéines de muscle lisse. Ainsi, durant l'embryogenèse, les organes tubulaires sont remplis de liquide. Ce

liquide génère une pression hydrostatique intraluminale qui cause un stress sur les parois. La tension mécanique s'applique sur les cellules musculaires en devenant qui subissent une élongation, un changement de forme; la quantité de SRF $\Delta$ 5 diminue au profit du SRF qui augmente (Yang, Beqaj et al. 2000, Jakkaraju, Zhe et al. 2003). Les cellules musculaires des intestins et des reins n'ont pas répondu à cet étirement sous les mêmes conditions expérimentales de la même manière que le poumon. Ceci porte à croire que le poumon est plus sensible à l'étirement que ces autres organes (Yang, Beqaj et al. 2000).

SRF joue ainsi un rôle important dans la différenciation et la formation du mésoderme au niveau embryonnaire. En effet, une inhibition du SRF empêche la différenciation des myoblastes en myotubules (Croissant, Kim et al. 1996). Une surexpression du SRF, par contre, produit une cardiomyopathie hypertrophique chez les souris. Ces résultats suggèrent que la présence de SRF est requise tôt pour une embryogenèse adéquate. Chez l'adulte, par contre, un niveau plus bas de SRF est observé (Chai and Tarnawski 2002).

#### *Au niveau de la cellule différenciée*

Le SRF permet l'expression de protéines spécifiques à la cellule musculaire différenciée et qui sont nécessaires à sa fonction. De ce fait, la liaison du SRF avec certains gènes est facilitée par son association avec des cofacteurs, tels que la myocardine (Pipes, Creemers et al. 2006). Tel que mentionné précédemment, cette liaison spécifique permet l'expression de gènes des protéines caractéristiques du phénotype contractile. Ainsi, chez un adulte, le SRF est surtout exprimé par des cellules musculaires (Chai and Tarnawski 2002, Camoretti-

Mercado, Dulin et al. 2003). Par contre, une liaison du SRF à ELK-1 engendre un phénotype prolifératif de la cellule (Buchwalter, Gross et al. 2004). Le SRF pourrait être à la tête de cette plasticité phénotypique du muscle lisse en réaction à son environnement et donc, moduler le remodelage musculaire.

#### *Autres fonctions du SRF*

Le SRF se retrouve dans le système nerveux en développement et dans celui de l'adulte. Le SRF jouerait un rôle dans les cellules neuronales (Knoll and Nordheim 2009). En effet, par son contrôle des dynamiques du cytosquelette de l'actine, il contrôle la migration neuronale, le prolongement des neurites et le ciblage des synapses. Ainsi, le SRF serait un instrument de la conversion d'un signal synaptique en un changement structurel des connections neuronales.

Étant donné que le SRF active les gènes de croissance, il est un composant important à inactiver dans le but de produire l'apoptose. Les caspases activées doivent donc cliver le SRF en deux sites spécifiques pour produire un SRF tronqué inactif (Drewett, Devitt et al. 2001). Un SRF mutant pour les sites de clivage pourrait empêcher l'apoptose et permettre la survie de la cellule lésée.

#### **2.2.2.1.4 Rôle potentiel dans les processus pathologiques**

##### *Obstruction mécanique du petit intestin*

Dans un modèle d'obstruction intestinal chez la souris, une perte d'efficacité fonctionnelle et un épaissement non uniforme de la couche musculaire du segment intestinal oral à l'obstruction d'origine congénitale ou acquise est observée. L'épaississement serait secondaire à une augmentation des demandes fonctionnelles et serait plus marqué

près de l'obstruction. Les cellules musculaires lisses situées oralement à l'insulte présentent d'abord une prolifération associée à une diminution de l'expression des protéines contractiles. La phase d'hyperplasie serait engendrée par une modification de la liaison du SRF à des promoteurs des cellules musculaires lisses. L'expression du cofacteur ELK-1 augmente durant cette première phase et compétitionne pour le même site de liaison sur le SRF que la myocardine, occasionnant une diminution des niveaux de myocardine dans le noyau. Ces mêmes cellules subissent ensuite une phase d'hypertrophie où des niveaux élevés de protéines contractiles sont observés. La quantité de myocardine augmente alors et est accompagnée d'une augmentation de l'expression des gènes de différenciation cellulaire. Les niveaux de SRF diminuent lors de la phase de prolifération et redeviennent à la normale lors de la phase d'hypertrophie (Chen, Chen et al. 2008). Par contre, d'autres études (Hendrix, Wamhoff et al. 2005, Chow, Bell et al. 2007) ont plutôt démontré une augmentation des niveaux de SRF dans les cellules hypertrophiques. Bien que ces résultats soient controversés, toujours est-il que le SRF est impliqué dans les mécanismes de remodelage du muscle lisse intestinal. Ce mécanisme pourrait également survenir au niveau du muscle lisse bronchique dans le souffle.

#### *Désordres cardiovasculaires hyperprolifératifs*

Les désordres cardiovasculaires hyperprolifératifs comprennent l'athérosclérose, l'occlusion des greffes veineuses, l'hypertension et la ré-obstruction des endoprothèses vasculaires. Comme c'est le cas lors d'obstruction mécanique du petit intestin, des changements surviennent dans les couches musculaires lisses de la paroi des vaisseaux atteints lors d'hypertension ou d'athérosclérose (Werth, Grassi et al. 2010).

Ainsi, par des mécanismes impliquant le SRF, il survient une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Le stimulus déclencheur du processus pathologique serait un bris de l'endothélium, un étirement mécanique ou un bris dans les couches plus profondes du vaisseau (Hoffmann and Mintz 2000). L'altération environnementale dans les lésions d'athérosclérose et/ou dans les sites d'insulte vasculaire occasionne la migration des cellules musculaires lisses et des myofibroblastes dans l'intima, la couche la plus centrale du vaisseau. Dans les premiers stades de la formation des lésions, il y a diminution de l'expression des protéines de contractilité, une réorganisation de leur cytosquelette et une augmentation de la synthèse d'ADN et de marqueur de prolifération. Dans les stades plus avancés des lésions, l'index de prolifération diminue suggérant un retour vers un état plus différencié (Owens, Kumar et al. 2004). Le degré de prolifération musculaire est corrélé avec la gravité de l'insulte (Hoffmann and Mintz 2000). La modulation phénotypique est un évènement clé de ce groupe de pathologie. Tel que démontré par l'inhibition du SRF dans des cellules musculaires lisses d'artères coronaires, ce facteur agirait comme régulateur positif du processus prolifératif de ces cellules (Werth, Grassi et al. 2010).

#### *Guérison d'ulcères œsophagiens*

Le SRF est impliqué dans le processus de guérison des ulcères œsophagiens. Son expression augmente lors d'ulcération gastrique et une thérapie génique à ce niveau encourage la reconstitution de l'épithélium et du muscle lisse chez le rat (Chai, Baatar et al. 2004). Le SRF est inductible par les facteurs de croissance et active des gènes précoces (c-fos, *cyr61*) important pour la guérison de lésions (Chai,

Norng et al. 2007). Il fonctionne comme plateforme régulatrice permettant la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire. De ce fait, Chai, Norng et al. (2007) ont déterminé que le SRF est essentiel à la différenciation des myofibroblastes induite par le «transforming growth factor  $\beta$ » (TGF $\beta$ ). Lors d'ulcère, les cellules épithéliales et les fibroblastes adjacents au site ulcéré sont activés par certaines molécules (par exemple le TGF $\beta$ ) et adoptent un phénotype de myofibroblaste qui, par sa capacité contractile, contribue à l'étape de contraction de la plaie. Les myofibroblastes sont des composants clé de la guérison des ulcères (Chai, Norng et al. 2007).

### 2.2.2.2 Les autres facteurs et cofacteurs

Les facteurs listés dans le tableau des facteurs et cofacteurs du muscle lisse (Tableau I) ont tous une action sur le muscle lisse, que ce soit celui des vaisseaux sanguin, des viscères du cœur ou des poumons. Cette liste, bien que non-exhaustive, décrit les facteurs et cofacteurs d'importance bien que certains facteurs ne soient pas mentionnés. Le lecteur est invité à consulter les références indiquées pour un supplément d'information. Certains de ces cofacteurs vont interagir avec le SRF et produire un changement dans la cellule musculaire lisse.

Tableau I. Facteurs et cofacteurs du muscle lisse

Famille du facteur	Nom du facteur/ cofacteur	Structure	Rôle	Mécanisme d'action	Référence
Facteur de complexe	ELK-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine N-terminal</li> </ul>	Lié au SRF, il régule la réponse des gènes de croissance et active la	Par compétition avec la myocardine pour le même site	(Buchwalter, Gross et al. 2004, Zhou,

tertiaire		(domaine de liaison à l'ADN) se lie spécifiquement à des sites de liaison E-Twenty Six (ETS)	transcription nucléaire.	de liaison sur le SRF.	Hu et al. 2005, Boros, Donaldson et al. 2009)
	SAF-A, Acinus, PIAS (SAP)-1a	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine B (se lie avec le SRF pour produire un complexe tertiaire)</li> </ul>	Fonction incertaine. Possède un domaine d'inhibition spécifique.	SAP-1 se lie au SRF sur des SRE de promoteur c-fos.	(Dalton and Treisman 1992, Maira, Wurtz et al. 1996, Hassler and Richmond 2001).
	NET	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine C-terminal (meilleure liaison à L'ADN)</li> </ul>	Région inhibitrice spécifique à ce cofacteur semble lui conférer une action inhibitrice du promoteur.	Cofacteur inhibiteur pouvant se lier au SRF	(Criqui-Filipe, Ducret et al. 1999) (Maira, Wurtz et al. 1996)
	Myocardine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Région N-terminale comportant trois motifs RPEL (domaine RPEL).</li> <li>• Domaine SAP (ligand de faible affinité avec l'ADN)</li> <li>• Séquence peptidique riche en glutamine et</li> </ul>	Cofacteur de transcription spécifique aux cellules musculaires lisses et cardiaques. Lié au SRF, elle induit l'expression de gènes du cytosquelette et des protéines contractiles	Forme un complexe tertiaire stable avec le SRF sur les régions CARG du gène ciblé, ce qui augmente la capacité de liaison du SRF à l'ADN	(Pipes, Creemers et al. 2006) (Parmacek 2008)



		<p>en régions basiques (site de liaison avec le SRF)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Région C-terminale occupe le rôle de domaine d'activation de la transcription (TAD)</li> </ul>			
	Facteur de transcription relié à la myocardine-A (MRTF-A) et MRTF-B	<p>Même structure que la myocardine.</p> <p>La région N-terminale (domaine RPEL) permet à ces derniers de se lier à l'actine</p>	Lorsque lié au SRF, permet le maintien homéostatique de la forme de la cellule, de l'activité extrusive et du potentiel contractile de la cellule	Lorsque la voie de signalisation du RhoA/Rho kinase est activée, il y a polymérisation de l'actine-G et libération du MRTF qui peut alors pénétrer dans le noyau pour se lier au SRF.	(Wang and Olson 2004) (Pipes, Creemers et al. 2006)
	GATA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Doigt Zinc (liaison à l'ADN)</li> <li>• Domaine MADS (interaction avec SRF)</li> </ul>	<p>Favorise l'expression de certains gènes du muscle cardiaque</p> <p>Rôle dans la conservation du phénotype différencié des cellules musculaires lisses des vaisseaux.</p>		(Nishida, Nakamura et al. 2002) (Haveri, Ashorn et al. 2009) (Yin and Herring 2005)

			Forme une triade avec le SRF et le Nkx-3.2 pour activer certains gènes du muscle lisse dans les artères		
Famille homéobox	NK	Région nommée homéodomaine ou homéobox (liaison avec des promoteurs de gènes spécifiques au muscle)	Durant l'embryogenèse, il régule la morphogenèse et la maturation fonctionnelle des cardiomyocytes ventriculaires, des cellules musculaires lisses dans les vaisseaux sanguins et du tractus digestif. Chez l'adulte, Nkx2-5 agit dans le maintien de l'homéostasie des cardiomyocytes et aurait possiblement un rôle cardioprotecteur.	Forme une triade avec le GATA6 et le SRF dans la couche médiale de muscle lisse des artères.	(Carson, Fillmore et al. 2000) (Nishida, Nakamura et al. 2002) (Akazawa and Komuro 2005) (Verzi, Stanfel et al. 2009)
	Barx		Il permet la différenciation de l'épithélium gastrique. Il régule les événements de remodelage du cytosquelette en stimulant l'expression d'un des premiers marqueurs de	Il se lie avec le SRF et forme un complexe tertiaire qui augmente son activité de transcription	(Kim, Buchner et al. 2005, Miletich, Buchner et al. 2005) (Herring, Kriegel et al. 2001)

			différenciation des myoblastes : l' $\alpha$ -actine du muscle lisse (SMA).		
	Prrx		Surtout impliqué dans le développement embryonnaire.	Prrx1 possède un domaine qui a la capacité de se lier au SRF	(Grueneberg , Natesan et al. 1992) (Bergwerff, Gittenberger-de Groot et al. 1998, Norris, Scott et al. 2000)
	Protéines LIM riches en cystéines (Crp)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine LIM N-terminal lie le SRF</li> <li>• Domaine LIM C-terminal lie le doigt Zinc C-terminal des protéines GATA-4 et -6</li> </ul>	Crp1 et Crp2 possèderaient le rôle de cofacteur et coadaptateur, ils permettent l'activation des gènes spécifiques du muscle lisse. Crp3 potentialiserait la liaison de MyoD à l'ADN et permettrait la différenciation myogénique au niveau du cœur.	Il relie les protéines GATA et le SRF.	(Chang, Belaguli et al. 2003) (Sagave, Moser et al. 2008)
	MEF2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine MADS-box dans sa région N-terminale (interaction avec l'ADN et</li> </ul>	Son rôle s'apparente à celui du SRF. Avec les autres facteurs de transcription cardiaques (GATA-4, Nkx2.5 et SRF), Mef2a permet la maturation	MEF2 est un activateur de la transcription, mais nécessite la liaison à un autre facteur de transcription pour agir sur ses	(Wu, Huang et al. 2011) (Potthoff and Olson 2007) (Schlesinger, Schueler et

		cofacteurs) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Domaine MEF2</li> <li>• Portion C-terminale (domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) (lie l'ADN)</li> </ul>	cardiaque, le développement de l'endothélium des vaisseaux sanguins et le développement du muscle lisse. Il aide au maintien de l'intégrité vasculaire et encourage le remodelage vasculaire lors de blessure	gènes cibles	al. 2011)
--	--	---	---	--------------	-----------

## **3. Méthodologie**

Cette étude fait partie d'un programme de recherche sur les facteurs contribuant au remodelage bronchique observé dans le souffle. Ainsi, les mêmes échantillons pulmonaires et données phénotypiques et physiologiques ont été utilisés dans d'autres études (Lanctot Setlakwe 2011, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011).

### **3.1 Animaux**

Onze chevaux ont été utilisés pour ce projet. Le troupeau était séparé en deux groupes. Le groupe de chevaux atteints de souffle comprenait quatre juments (Standardbred, Quarter Horse et croisé) et deux hongres (Arabe et croisé). La maladie a été diagnostiquée selon les signes cliniques, des résultats de mécanique respiratoire anormaux (résistance et élastance pulmonaire augmentées) et un lavage bronchoalvéolaire (LBA) présentant une augmentation de neutrophiles suite à une exposition antigénique au foin et à la paille. Ces chevaux étaient appariés en âge ( $16,8 \pm 0,9$  ans (15-19)) à des chevaux contrôles ( $15,5 \pm 0,8$  ans (11-22)). Le groupe contrôle comprenait 5 juments (Standardbred, croisé) exemptes de la maladie. Le poids médian des chevaux contrôle était de  $504 \pm 60,5$  kg (405-555 kg), tandis que celui des chevaux atteints de souffle était de  $500 \pm 46,0$  kg (430-545 kg). Les chevaux ont tous été jugés en santé, soit exempts de maladies graves (exception faite du souffle), par examen physique complet, examen sanguin et biochimique. Tous ces chevaux ont été vaccinés et vermifugés régulièrement.

### **3.2 Protocole expérimental animal**

#### **3.2.1 Conditions environnementales**

Les chevaux ont été placés au pâturage pour une période de plus de 3 mois avant le début de l'étude afin d'induire une rémission chez les chevaux atteints de souffle. Durant cette période, les chevaux étaient nourris avec des granules de foin

et suppléments deux fois par jour en plus d'avoir accès à l'herbe du pâturage. Les chevaux atteints de souffle ne présentaient aucun signe clinique de la maladie à ce moment et des échantillons et mesures ont été récoltés à ce moment, nommé T0. Les chevaux ont été par la suite placés dans l'écurie et exposés à une stimulation antigénique constituée de la stabulation, la litière de paille et le foin dont ils étaient nourris. Les chevaux étaient aussi nourris avec des suppléments deux fois par jour. Après trente jours d'exposition (T30), des échantillons ont été récoltés et leur fonction respiratoire mesurée à nouveau.

### **3.2.2 Fonction respiratoire**

Des mesures de la fonction pulmonaire ont été effectuées à différents temps durant l'expérimentation (T0, T1 et T30 où T1 correspond à une journée d'exposition antigénique et T30 à trente jours d'exposition). La méthode par laquelle les mesures ont été effectuées a été décrite précédemment (Jean, Vrins et al. 1999).

Ces mesures sont effectuées sans sédation sur des chevaux placés dans un travail. Les chevaux portent un masque étanche couvrant les naseaux. Un pneumotachographe réchauffé à 37 °C est attaché au masque et sert à mesurer le débit d'air lors de l'inspiration et de l'expiration. Des mesures de pressions transpulmonaires sont aussi obtenues à l'aide d'un cathéter placé dans le dernier tiers de l'œsophage. Les mesures de débit et de pressions transpleurales servent à calculer les valeurs de résistance et d'élastance pulmonaire tel que décrit précédemment (Jean, Vrins et al. 1999).

### **3.2.3 Lavage bronchoalvéolaire**

Un lavage bronchoalvéolaire a été effectué chez tous les chevaux sous sédation aux différents temps. Cette technique a déjà été décrite (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011) et utilise un vidéo-endoscope de 2,5 mètres (Olympus

Medical System corp., Tokyo, Japan) inséré dans le méat ventral de la narine pour parvenir aux voies respiratoires supérieures. L'endoscope est ensuite avancé dans les bronches. De la saline isotonique est infusée (deux fois 250mL) et récupérée dans des récipients de plastique non-adhérent (VWR®, 16128-841), puis placé sur de la glace. Le fluide récupéré est analysé à l'intérieur d'une heure suite à la récolte. L'analyse implique la filtration et la centrifugation (1500 rpm à 5 °C pour 5 minutes) du liquide. Les culots obtenus sont remis en suspension (médium RMPI 1640). Un comptage des cellules totales est effectué à l'aide d'un hémocytomètre. Un cytopspin est effectué, puis coloré au Wright-Giemsa et bleu de Toluène. Un comptage différentiel de cellules est aussi réalisé.

### **3.2.4 Biopsies de poumon périphérique par thoracoscopie**

Des échantillons de poumon périphérique ont été récoltés sur tous les chevaux de l'étude par thoracoscopie à T0 et T30 (Relave, David et al. 2008). La procédure a été effectuée sur les chevaux placés dans un travail sous sédation. Un hémithorax fut sélectionné aléatoirement et l'hémithorax contra-latéral fut utilisé pour la procédure subséquente.

## **3.3 Anticorps**

Un anticorps primaire polyclonal de lapin contre la région c-terminale du SRF humain a été utilisé (Santa Cruz, SC-335). Cet anticorps fonctionne pour le Western blot, l'immunofluorescence et l'immunohistochimie, selon la compagnie. La séquence d'acides aminés 55 à 507 du SRF humain (NM\_003131) a été comparée au SRF du cheval et présentait 97,2% d'homologie. Un anticorps primaire monoclonal de souris anti-SMA clone 1A4a été utilisé dans cette expérimentation (Sigma, A2547), cet anticorps ayant déjà été utilisé chez le cheval avec succès (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006). L'anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin hautement détecté Alexa Fluor 594 (Invitrogen, A11037) a été utilisé pour l'anticorps anti-SRF. Un anticorps

secondaire IgG de chèvre anti-souris hautement cross-absorbed Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A11029) pour détecter l'anticorps anti  $\alpha$ -SMA a été utilisé.

### **3.4 Immunobuvardage de Western**

Un immunobuvardage de type western a d'abord été effectué dans le but de déterminer la présence du SRF dans le poumon équin, ainsi que pour valider la spécificité de l'anticorps utilisé pour détecter le SRF équin. Les expérimentations ont été exécutées selon le protocole décrit en (ANNEXE A). La dilution d'anticorps primaire utilisée est de 1 :1000. L'anticorps est le même que pour l'immunofluorescence et est décrit plus haut. La dilution pour l'anticorps secondaire était de 1 :2000. Un extrait de rate de cheval (ANNEXE A) à concentration de 200 $\mu$ g a été utilisé comme contrôle positif pour le SRF. Un extrait de poumon équin (ANNEXE A) à concentration de 100 $\mu$ g et 200 $\mu$ g a été placé dans les autres puits du gel. Les expérimentations ont été effectuées en duplicata. Un anticorps secondaire IgG de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (HPR-linked) pour détecter l'anticorps anti-SRF (*Cell Signaling*,7074) a été utilisé.

### **3.5 Immunofluorescence**

Suite au prélèvement, les échantillons de poumons ont été placés dans une solution de formaldéhyde 4% faite à partir d'une solution de 37% (le pH du tampon se situe entre 6,5 et 7 et ne contient pas de méthanol) pour une période de 24h. Ensuite, les échantillons ont été enrobés de paraffine et montés sur des blocs de paraffine. Les blocs contenant les échantillons pulmonaires ont été coupés au microtome (5 $\mu$ m) et les coupes placées sur des lames Superfrost Plus. Les lames ont par la suite été placées dans un incubateur à 37° pour 16-18h de manière à permettre une adhésion du tissu à la lame.



Le protocole de double immunofluorescence utilisé lors de cette expérimentation a été celui de *Cell Signaling*, modifié (ANNEXE C). Les lames montées ont été déparaffinées et ensuite placées dans une solution de tampon citrate à pH 6 à température ambiante. La solution a été portée au point d'ébullition pour une période de dix minutes. Pour l'étape d'immunomarquage, les lames ont d'abord été incubées durant une heure dans une solution de blocage avec sérum de chèvre (sérum de la même espèce que l'anticorps secondaire). Ensuite, la solution d'anticorps primaire anti-SRF a été appliquée sur les lames. Les solutions d'anticorps primaires ont été préparées en diluant les anticorps (1 :250) dans la solution de blocage avec sérum dans des aliquots séparés. Les lames ont ensuite été placées à 4 °C pour 16-18h. Suite à un rinçage, la solution d'anticorps primaire anti  $\alpha$ -SMA (1 :250) a été appliquée. Puis les lames ont été incubées à 37°C pour une heure. Ensuite, les anticorps secondaires ont été appliqués sur les lames. L'incubation a été faite à température ambiante pour une période de deux heures. La solution d'anticorps secondaire s'effectue en diluant les deux anticorps secondaires (1 :1000) dans une même solution de blocage sans sérum. Par la suite, le Vectashield® a été appliqué et le couvre-lame a été déposé. Les lames ont ensuite été placées à plat au congélateur à -20°C jusqu'à la lecture.

### **3.6 Méthode de récolte des données**

Les lames ont été observées au microscope (AxioImager microscope M1 de *Zeiss*) à l'insu pour l'identité du cheval, le groupe et le temps auquel l'échantillon a été prélevé. L'observation sommaire des lames fut effectuée sous la lumière 4',6-Diamidino-2-Phénylindole, Dihydrochloride (DAPI) et, lorsqu'une voie respiratoire était repérée, celle-ci fut centrée dans le champ et photographiée à un grossissement de 20X puis 40X (ANNEXE D). Ainsi, le nombre de voies respiratoires par échantillon et par cheval était variable mais un nombre minimal de 5 voies respiratoires par cheval, par groupe et par temps a été établi. Les voies respiratoires en coupe transverse ont été photographiées à l'aide d'un programme spécialisé (AxioVision Rel. 4.6 avec la caméra AxioCam MRm de *Zeiss*). Les photos ont par la suite été ajustées selon un

protocole établi (ANNEXE D). La prise de photo permet l'assemblage d'une image composée rassemblant les couleurs émises par les fluorochromes des anticorps secondaires sur la même image, ce qui n'est pas possible d'observer au microscope. De ce fait, la correspondance des signaux de couleurs pouvait être appréciée, soit le vert pour  $\alpha$ -SMA, le rouge pour le SRF et le bleu pour les noyaux (colorés grâce au Vectashield®).

### **3.7 Technique morphométrique/analyse des images**

L'analyse des images a été effectuée grâce au programme MBF *Image J*<sup>1</sup> (National Institutes Health) avec ajout du *Plugin Point Picker*<sup>2</sup> pour aider au comptage des cellules (ANNEXE E). Afin de corriger pour la taille des voies respiratoires, le périmètre de la membrane basale de chaque voie a été mesuré. La base des cellules épithéliales était suivie sur une distance correspondant à la section de muscle lisse analysée. Une lame de calibration de 2 mm avec intervalles de 0,01 mm a servi pour prendre les mesures de périmètre.

---

<sup>1</sup> Image J®, McMaster Biophotonics Facility Image J pour Microscope version 1.43u, National Institute Health

<sup>2</sup> Point Picker, par P. Thévenaz

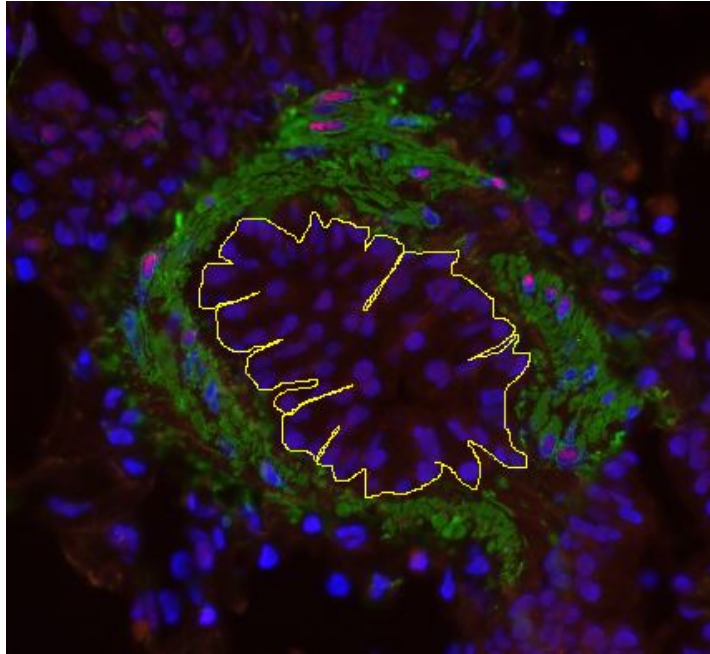


Figure 1. Tracé de la membrane basale de l'épithélium d'une voie respiratoire

La mesure de l'expression de SRF a été effectuée de manière quantitative. Pour une voie respiratoire donnée, tous les noyaux se trouvant dans du muscle lisse ont été comptés. Les noyaux émettaient un signal bleu (correspondant au DAPI) et le muscle lisse un signal vert (correspondant à  $\alpha$ -SMA). Parmi les noyaux situés dans le muscle lisse, ceux émettant un signal rouge se trouvant dans le noyau bleu étaient considérés comme étant positifs pour le SRF. Le pourcentage de cellules exprimant le SRF, pour chaque voie respiratoire, a été calculé à partir de ces données. Le nombre de cellules exprimant le SRF a aussi été corrigé en divisant ce nombre par le périmètre au carré de la lumière de la voie respiratoire (James, Hogg et al. 1988).

### 3.8 Analyses statistiques

La moyenne des valeurs a été calculée pour chaque individu à chaque temps. Un modèle linéaire à mesures répétées avec le temps comme facteur intra-sujet et les

traitements comme facteur entre sujets a été utilisé<sup>3</sup>. La correction séquentielle de Bonferroni a servi à ajuster le seuil alpha de chaque comparaison. Des valeurs de P de moins de 0,05 étaient considérées significatives.

---

<sup>3</sup> Logiciel SAS V.9.2 (Cary, N.C.)

## 4. Exposé et analyse des résultats

### 4.1 Immunobuvardage de type Western

Le contrôle positif utilisé était un extrait de rate à concentration de 200 $\mu$ g. Un extrait de poumon équin homogénéisé à concentration de 100 $\mu$ g et 200 $\mu$ g a été testé. La concentration de 200 $\mu$ g étant trop concentrée, seul l'extrait de poumon à 100 $\mu$ g était lisible. Le poids moléculaire attendu pour SRF était entre 40-67 kDa (Chai and Tarnawski 2002). Une bande bien définie a été obtenue à un poids moléculaire correspondant à 67 kDa.

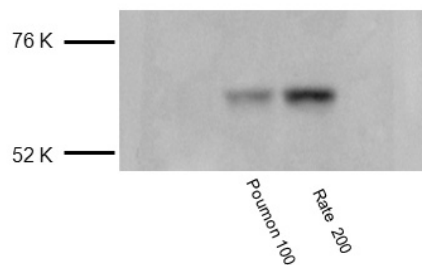


Figure 2. Immunobuvardage de type Western pour le SRF équin

### 4.2 Voies respiratoires périphériques

Un total de 207 voies ont été analysées. La distribution des échantillons est ainsi faite : 104 voies respiratoires périphériques obtenues de chevaux contrôle et 103 voies de chevaux atteints de souffle. Les tableaux I et II décrivent la distribution de ces voies. La taille des voies évaluées est de 3000  $\mu$ m et moins, ce qui correspond à des voies respiratoires périphériques (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006). Le protocole d'immunofluorescence a marqué avec efficacité l' $\alpha$ -SMA du muscle lisse bronchique et le SRF dans les noyaux des cellules musculaires lisses seulement. Aucun signal n'a été détecté dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses (Figure 3).

Tableau II. Nombre de voies analysées par cheval à chacun des temps

<b>Cheval</b>	<b>Groupe</b>	<b>Nombre de voies à T0</b>	<b>Nombre de voies à T30</b>
32	Contrôle	11	12
53	Contrôle	21	12
68	Contrôle	7	15
87	Contrôle	6	6
106	Contrôle	8	6
40	Souffle	6	8
61	Souffle	8	7
103	Souffle	5	13
123	Souffle	8	9
306	Souffle	12	12
312	Souffle	7	8

Tableau III. Nombre de voies analysées par groupe à chacun des temps

<b>Groupe</b>	<b>Nombre de voies à T0</b>	<b>Nombre de voies à T30</b>	<b>Total</b>
Contrôle	53	51	104
Souffle	46	57	103
Total	<u>99</u>	<u>108</u>	<u>207</u>

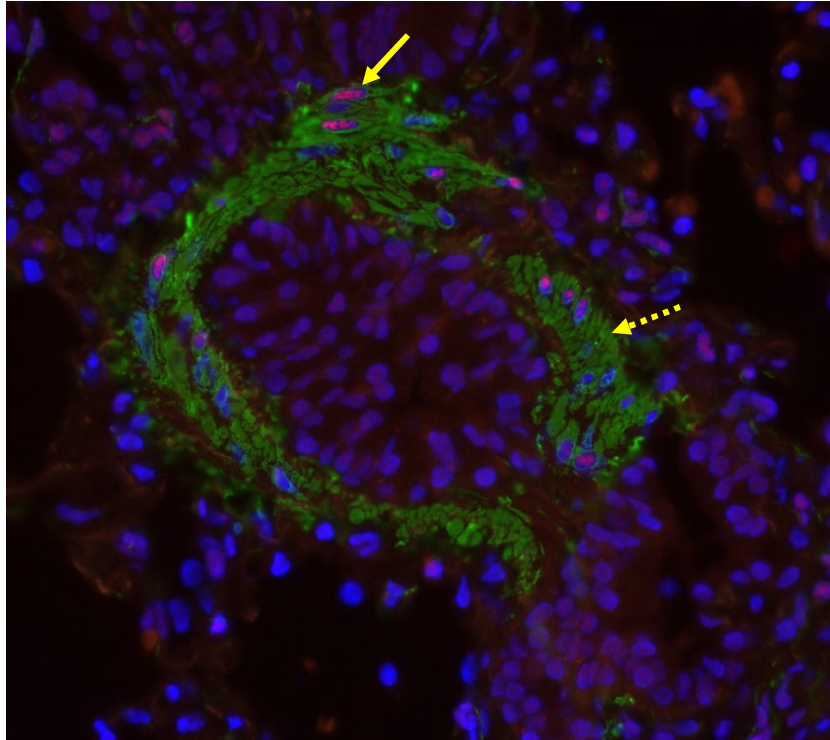


Figure 3. Voie respiratoire périphérique de cheval atteint de souffle. L' $\alpha$ -SMA (flèche pointillée) et le SRF sont colorés par immunofluorescence. Les noyaux des cellules musculaires lisses étaient positifs pour la présence de SRF (flèche pleine).

### **4.3 Expression du SRF dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle**

Avant exposition aux antigènes, la moyenne du pourcentage de noyaux de muscle lisse bronchique exprimant le SRF est semblable entre les deux groupes (Figure 4). Les valeurs sont légèrement plus dispersées pour le groupe contrôle comparativement au groupe atteint de souffle. Suite à l'exposition antigénique, on remarque une différence non significative entre les pourcentages de noyaux de muscle lisse bronchique exprimant le SRF des deux groupes (Figure 4) ( $P=0.033$ , non significatif après la correction séquentielle de Bonferroni).

Il y a une augmentation significative ( $P=0.014$ ) du pourcentage de noyaux de muscle lisse exprimant le SRF suite à stimulation antigénique chez les chevaux atteints de souffle (Figure 4). Les chevaux contrôles ne semblent pas démontrer une augmentation du pourcentage de noyaux de myocytes bronchiques exprimant le SRF, leurs valeurs restant sensiblement les mêmes aux deux temps.



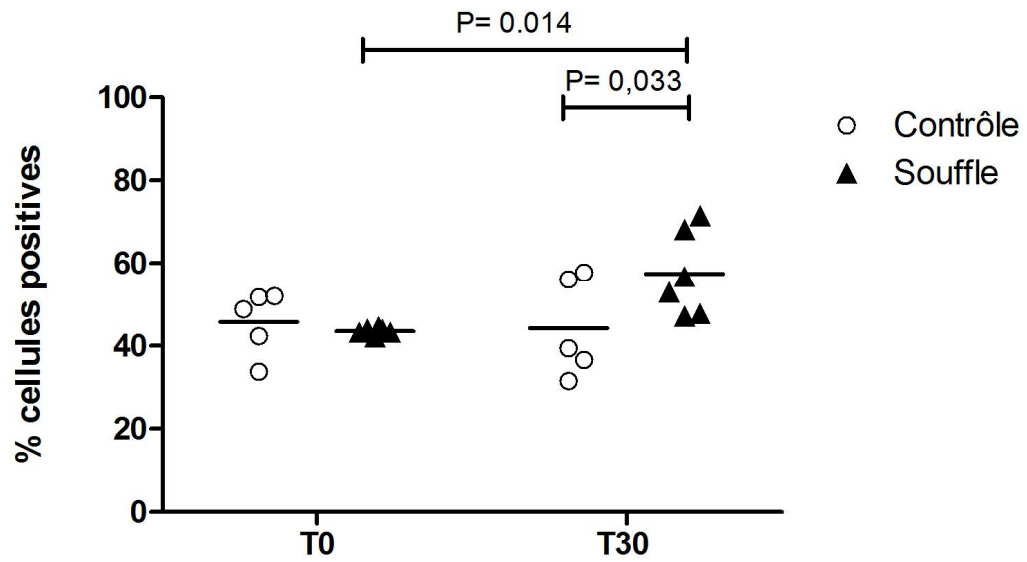


Figure 4. Pourcentage de myocytes bronchiques exprimant le SRF chez les chevaux contrôles et ceux atteints de souffle avant et après stimulation antigénique

#### **4.4 Expression du SRF par nombre de cellules dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle**

Les résultats observés du pourcentage de cellules positives au SRF ne se répètent pas avec la mesure du nombre de cellules positives au SRF corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré. Tout d'abord, on remarque une différence entre les deux groupes avant exposition antigénique en ce qui a trait au nombre de cellules de muscle lisse exprimant le SRF (Figure 5).

Il n'y a qu'une faible augmentation, non significative, du nombre de cellules de muscle lisse bronchique exprimant le SRF suite à l'exposition aux antigènes chez les chevaux atteints de souffle. Cette augmentation est également observée chez le groupe contrôle. Suite à la stimulation antigénique de 30 jours, on observe la même tendance entre les deux groupes dans le nombre de cellules exprimant le SRF (Figure 5).

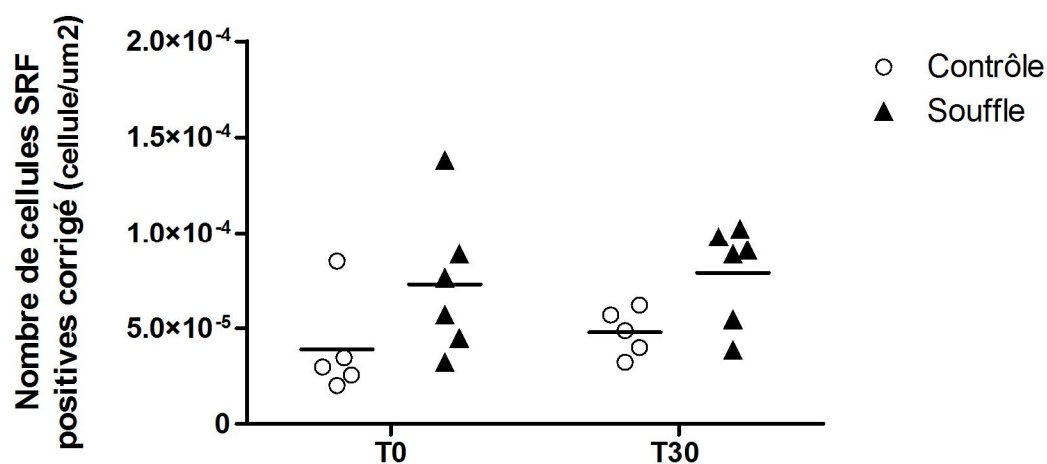


Figure 5. Nombre de cellules exprimant le SRF dans les myocytes bronchiques chez les chevaux contrôle et ceux atteints de souffle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré

Lorsque le SRF est exprimé en nombre de cellules par périmètre carré, il y a une différence non significative entre les groupes et aucune augmentation évidente dans le temps. Cependant, en groupant cette tendance, on observe que, tant à T0 qu'à T30, elle devient significative ( $P=0.031$ ) d'un groupe par rapport à l'autre tous temps confondus (effet de groupe) (Figure 6). Il y a donc un plus grand nombre de cellules exprimant le SRF chez les chevaux atteints de souffle et ce peu importe l'exposition aux antigènes.

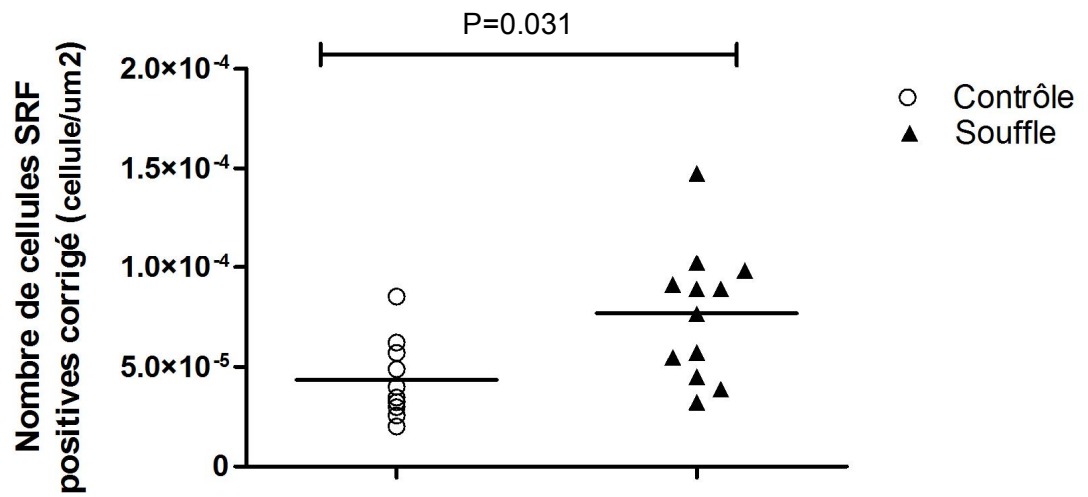


Figure 6. Nombre de cellules exprimant le SRF dans les myocytes bronchiques dans les deux groupes tous temps confondus, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré

## **4.5 Distribution de l'expression du SRF dans les voies respiratoires**

De manière générale, la distribution de la taille des voies est semblable à T0 et à T30. Aussi, la majorité des points sur les graphiques se situent sous 1000  $\mu\text{m}$  de périmètre de membrane basale pour les chevaux contrôles et les chevaux atteints de souffle. Ainsi, la population de voies respiratoires est relativement similaire chez tous les chevaux.

La distribution du pourcentage de cellules positives au SRF par rapport au périmètre des voies, chez les chevaux contrôles (Figure 7) tout comme chez les chevaux atteints de souffle (Figure 8), adopte un profil nuage de point. La distribution du pourcentage de cellules SRF positives par rapport à la taille des voies est très dissipée chez les chevaux contrôles avant et après stimulation antigénique, alors qu'on observe l'augmentation décrite précédemment chez les chevaux atteints de souffle (Figure 8). On peut également observer que l'expression du SRF ne semble pas affectée par la taille des voies respiratoires.

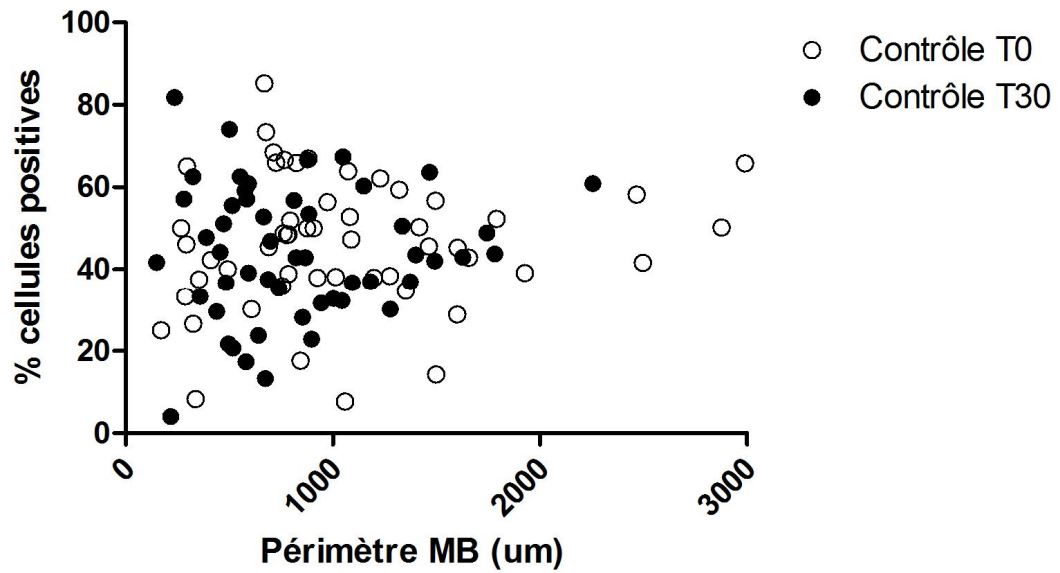


Figure 7. Distribution, selon la taille des voies respiratoires, du pourcentage de cellules musculaires lisses exprimant le SRF chez les chevaux contrôles

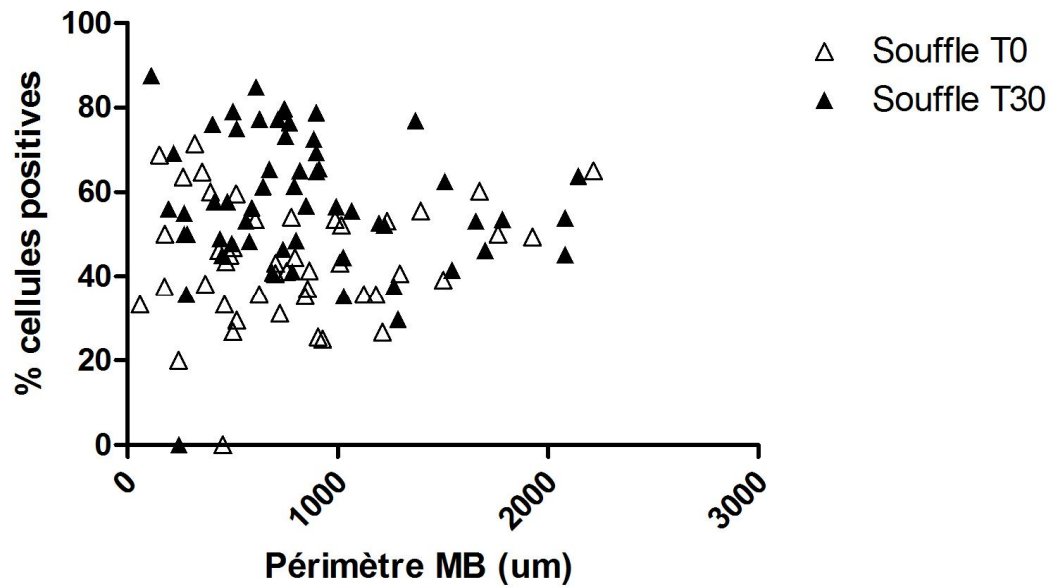


Figure 8. Distribution, selon la taille des voies respiratoires, du pourcentage de cellules musculaires lisses exprimant le SRF chez les chevaux atteints de souffle

Lorsque l'expression de SRF est exprimée en nombre de cellules par rapport au périmètre de membrane basale, on obtient un profil de distribution du nombre de myocytes bronchiques exprimant le SRF de décroissance exponentielle chez les chevaux atteints de souffle (Figure 10). Il semble que les plus petites voies respiratoires expriment le plus de SRF. Tel que décrit précédemment, l'expression de SRF ne semble pas plus élevée chez les chevaux atteints de souffle suite à une exposition antigénique.

La distribution de l'expression de SRF chez les chevaux contrôles ressemble plus à une ligne droite (Figure 9) par rapport à la distribution chez les chevaux souffle (Figure 10). Ce type de distribution porte plutôt à croire que l'expression de SRF est peu influencée par la taille des voies chez les chevaux du groupe contrôle.

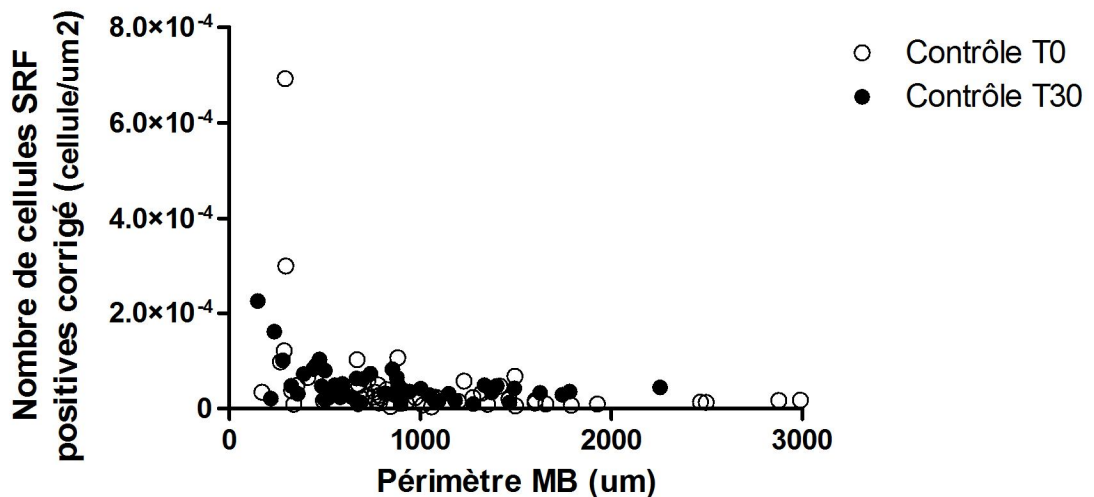


Figure 9. Distribution du nombre de cellules de muscle lisse bronchique exprimant le SRF chez les chevaux contrôle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré.

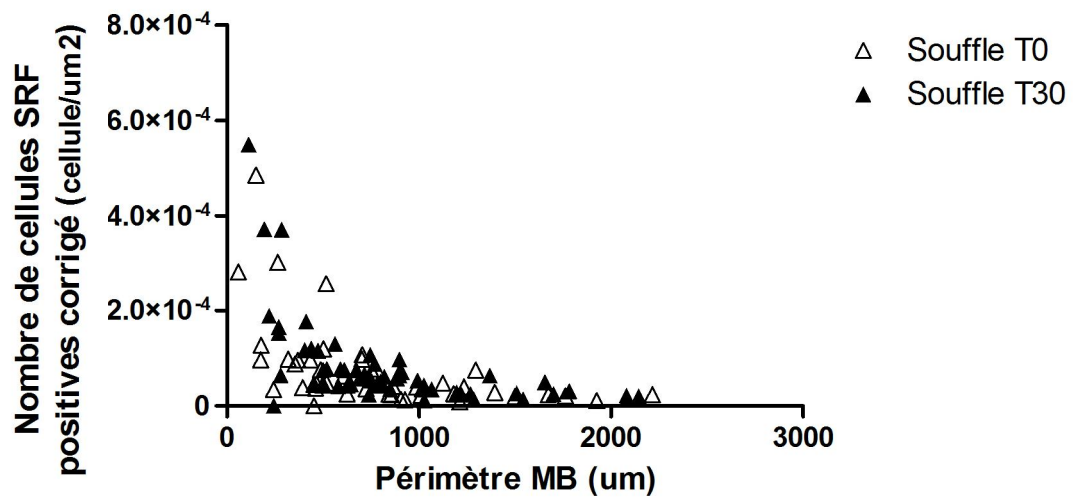


Figure 10. Graphique de la distribution du nombre de cellules de muscle lisse exprimant le SRF chez les chevaux atteints de souffle, corrigé selon le périmètre de la membrane basale au carré.



## **5. Discussion générale**

L'objectif de cette étude était d'explorer certains mécanismes moléculaires impliqués dans les possibles changements phénotypiques affectant la cellule musculaire bronchique dans la pathologie du souffle chez le cheval. De ce fait, nous avons examiné les effets d'une exposition antigénique sur l'expression du SRF, un facteur de transcription central au remodelage du muscle lisse dans d'autres tissus (Owens, Kumar et al. 2004, Hendrix, Wamhoff et al. 2005, Chai, Norng et al. 2007, Chow, Bell et al. 2007, Chen, Chen et al. 2008, Werth, Grassi et al. 2010), mais dont les effets n'ont pas encore été étudiés dans le muscle lisse bronchique. La présence du SRF fut donc observée chez des chevaux sains ainsi que chez des chevaux atteints de souffle qui possédaient un remodelage pulmonaire bien établi (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Les résultats démontrent une augmentation significative du pourcentage de cellules exprimant le SRF suite à une stimulation antigénique chez les chevaux atteints de souffle. Cette augmentation est d'autant plus significative qu'à T0 (chevaux au pâturage afin d'induire la rémission clinique chez les chevaux atteints du souffle), le pourcentage de cellules exprimant le SRF est semblable pour les chevaux atteints de souffle et les chevaux contrôles, et demeure stable chez les chevaux contrôles à T30 (écurie et exposition au foin). Au contraire, une expression accrue du SRF est observée dans les voies respiratoires périphériques des chevaux atteints du souffle suite à une exposition antigénique, là où le remodelage est le plus marqué (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006). Ainsi, nos résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le SRF joue un rôle dans le remodelage du muscle lisse bronchique lors de stimulation antigénique chez des chevaux atteints de souffle.

### **5.1 Effets de l'exposition antigénique sur l'expression de SRF**

L'augmentation de l'expression du SRF uniquement dans les myocytes bronchiques des chevaux atteints du souffle suite à une exposition antigénique indique une participation de ce facteur de transcription dans la pathogénie de la maladie. Toutefois, comme son expression peut être à la fois associée aux phénotypes de

différenciation (hypertrophie) ou de prolifération (hyperplasie) (Miano, Long et al. 2007), les résultats de l'étude ne permettent pas à elles seules de conclure quant à une polarisation vers un phénotype musculaire particulier.

Selon une étude menée sur les mêmes échantillons (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011), la masse de muscle lisse bronchique est plus élevée chez les chevaux atteints de souffle comparativement aux chevaux contrôles. L'expression accrue du SRF dans la cellule musculaire lisse bronchique suite à une stimulation antigénique, en association avec une masse de muscle lisse déjà augmentée chez un cheval atteint de souffle, pourrait indiquer une préférence pour un profil différencié (hypertrophie). Toutefois, un profil prolifératif (hyperplasie) reste également probable, considérant qu'un marqueur de prolifération était également plus élevé dans le muscle lisse bronchique des chevaux atteints de souffle (Herszberg, Ramos-Barbon et al. 2006, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Ainsi, le renouvellement cellulaire parviendrait à un certain équilibre dynamique et la masse de muscle lisse resterait inchangée suite à 30 jours d'exposition antigénique, et ce, même en présence d'une hyperplasie musculaire puisque l'apoptose musculaire était également accrue (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Le SRF pourrait donc participer au maintien de cette masse musculaire lisse chez les chevaux atteints de souffle en favorisant à la fois un profil prolifératif et un profil différencié.

De plus, l'effet de groupe observé dans le nombre de cellules corrigé pour le périmètre de membrane basale (Figure 6) pourrait refléter l'augmentation de masses de muscle lisse bronchique démontrée chez les chevaux atteints de souffle comparativement aux chevaux contrôles (Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Cette augmentation de masse de muscle lisse pourrait être relativement plus importante que les variations de pourcentage de noyaux exprimant le SRF et être masquée par l'augmentation de pourcentage observée avec l'exposition antigénique (Figure 4).

La disparité entre les résultats des deux types de mesures du SRF, soit le comptage cellulaire et le pourcentage, pourrait s'expliquer par la méthode de correction des données. La mesure du nombre de cellule exprimant le SRF était corrigée par rapport à la mesure du périmètre de la membrane basale. Il est possible que ce type de méthode de correction ne soit pas adapté à ce genre de mesure ou bien, la mesure du nombre de cellules exprimant le SRF pourrait ne pas nécessiter de correction ce qui expliquerait la disparité des résultats. La mesure du pourcentage de cellules exprimant le SRF, quant à elle, ne comportait pas de méthode de correction étant donné la nature de cette mesure. Le problème pourrait également résider dans la prise de mesure du périmètre de la membrane basale qui comporte une possible inexactitude, bien que cette donnée soit corrigée par l'entremise des méthodes de correction statistiques. Une certaine tendance est tout de même observée dans la mesure du SRF par le comptage des cellules positives au SRF.

## **5.2 Implication du SRF dans le souffle**

Le mécanisme sous-jacent au remodelage du muscle lisse bronchique chez les chevaux atteints du souffle n'est pas encore élucidé. Cependant, la pathogénie du muscle lisse d'autres tissus impliquant le SRF a été explorée et pourraient servir de modèle dans la compréhension du remodelage asthmatique. Par exemple lors d'obstruction partielle chronique du petit intestin, la portion musculaire du segment intestinal oral à l'obstruction s'épaissit et perd de son efficacité fonctionnelle (Chen, Chen et al. 2008). À cet endroit les cellules musculaires subissent une hyperplasie suivie d'une hypertrophie. Cette observation indique que la cellule musculaire lisse possède une certaine plasticité phénotypique. En réponse à des stress environnementaux, elle peut donc favoriser un phénotype lui permettant de mieux s'adapter, parfois au détriment de sa fonction.

Notre étude démontre une implication du SRF dans le souffle chez les chevaux. Il y a une association entre l'exposition antigénique, les signes cliniques de l'animal et

l'augmentation du SRF dans les voies respiratoires. En effet, suite à une stimulation antigénique produisant un stress sur les bronches, le pourcentage de cellules exprimant le SRF est augmenté. Ceci représente une adaptation à l'environnement, au stress supplémentaire appliqué par les antigènes environnementaux, de la part des cellules musculaires lisses. Avantage ou un inconvénient pour la cellule, ce serait la réaction à un stress.

La détresse respiratoire observée chez les chevaux atteints de souffle est conséquente aux multiples processus et changements affectant les voies respiratoires. Des mécanismes inflammatoire et mécanique causent un stress sur les voies respiratoires. Il est rapporté que les chevaux contrôles présentent également une inflammation des voies respiratoires suite à une exposition antigénique (Tremblay, Ferland et al. 1993, Leclere, Lavoie-Lamoureux et al. 2011). Cependant ces individus ne développent aucune obstruction des voies respiratoires, changement au niveau du muscle lisse bronchique ou détresse respiratoire. On pourrait donc conclure que l'inflammation n'est pas un élément important à l'activation du SRF dans les voies respiratoires chez les chevaux, puisque l'expression du SRF demeure inchangée chez les chevaux contrôles. Toutefois, des processus différents pourraient causer l'inflammation neutrophilique observée dans les deux groupes de chevaux. Notre évaluation du processus inflammatoire tissulaire pulmonaire n'étant que partielle, nous ne pouvons conclure quant au rôle possible de l'inflammation dans l'expression du SRF dans le souffle.

En absence de stimulation antigénique, les chevaux atteints du souffle ne présentent pas de difficulté respiratoire. Toutefois, les altérations morphologiques (remodelage) affectant les voies respiratoires persistent entre les crises. De même, une hyperplasie des cellules musculaires lisses persiste alors que l'expression du SRF n'est pas augmentée. Combinés, ces résultats suggèrent que le SRF n'est pas impliqué dans

l'hyperplasie du muscle lisse bronchique, ou que la régulation de celle-ci est complexe, et requiert d'autres cofacteurs ou l'activation d'autres voies de signalisations.

### **5.3 Ouverture**

Les mécanismes contrôlant les changements encourus par le muscle lisse bronchique dans la pathologie du souffle sont encore peu connus. En se basant sur le comportement du muscle lisse viscéral et vasculaire décrit dans la littérature (Hoffmann and Mintz 2000, Owens, Kumar et al. 2004, Chen, Chen et al. 2008), ainsi que sur notre compréhension du remodelage du muscle lisse des voies respiratoires dans l'asthme (Munakata 2006, An, Bai et al. 2007, Ozier, Allard et al. 2011, James, Elliot et al. 2012), il est spéculé que le muscle lisse bronchique pourrait adopter plusieurs phénotypes pour parvenir à produire les changements observés. Le SRF est le facteur de transcription contrôlant la plasticité phénotypique de la cellule musculaire lisse. Le protocole expérimental de cette étude n'a pas permis d'identifier une association de phénotype cellulaire avec le SRF. Pour ce faire, une étude des cofacteurs principaux du SRF (myocardine, ELK-1) dans le muscle lisse bronchique en association avec la mesure de la masse de muscle lisse permettrait de mieux définir le phénotype qu'adopte la cellule musculaire lisse bronchique chez le cheval atteint de souffle. La compréhension des mécanismes moléculaires influençant ce processus faciliterait le développement de nouvelles thérapies plus ciblées ou stratégies dans le traitement du souffle et de l'asthme.

## **6. Conclusion**

Les résultats démontrent pour la première fois l'implication du SRF dans les myocytes des voies respiratoires suite à une stimulation antigénique dans un modèle équin d'asthme bronchique. Une augmentation significative de l'expression du SRF dans les myocytes des voies respiratoires des chevaux atteints de souffle suite à une stimulation antigénique a été mise en évidence. Cette découverte suggère que le SRF est important au remodelage du muscle lisse des voies respiratoires des chevaux atteints de souffle lorsque ceux-ci sont exposés aux antigènes environnementaux. Cette étude aide à la compréhension du dynamisme phénotypique de la cellule musculaire lisse bronchique dans le souffle chez les chevaux, ce qui offrira ultimement des options thérapeutiques pour le traitement de cette maladie.

## 7. Bibliographie

- Ainsworth, D. M., G. Grunig, M. B. Matychak, J. Young, B. Wagner, H. N. Erb and D. F. Antczak (2003). "Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells." *Vet Immunol Immunopathol* **96**(1-2): 83-91.
- Akazawa, H. and I. Komuro (2005). "Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases." *Pharmacol Ther* **107**(2): 252-268.
- An, S. S., T. R. Bai, et al. "Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma." *Eur Respir J* **29**(5): 834-860.
- Antonelli, A., R. Torchio, L. Bertolaccini, A. Terzi, F. Rolfo, P. Agostoni, C. Gulotta, V. Brusasco and R. Pellegrino (2012). "Contribution of beta-adrenergic receptors to exercise-induced bronchodilatation in healthy humans." *Respir Physiol Neurobiol* **184**(1): 55-59.
- Badri, K. R., Y. Zhou and L. Schuger (2008). "Embryological origin of airway smooth muscle." *Proc Am Thorac Soc* **5**(1): 4-10.
- Bai, T. R. and D. A. Knight (2005). "Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences." *Clin Sci (Lond)* **108**(6): 463-477.
- Bartner, L. R., N. E. Robinson, M. Kiupel and Y. Tesfaigzi (2006). "Persistent mucus accumulation: a consequence of delayed bronchial mucous cell apoptosis in RAO-affected horses?" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(4): L602-609.
- Benayoun, L., A. Druilhe, M. C. Dombret, M. Aubier and M. Pretolani (2003). "Airway structural alterations selectively associated with severe asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(10): 1360-1368.
- Bergwerff, M., A. C. Gittenberger-de Groot, M. C. DeRuiter, L. van Iperen, F. Meijlink and R. E. Poelmann (1998). "Patterns of paired-related homeobox genes PRX1 and PRX2 suggest involvement in matrix modulation in the developing chick vascular system." *Dev Dyn* **213**(1): 59-70.
- Black, J. L., M. Roth, J. Lee, S. Carlin and P. R. Johnson (2001). "Mechanisms of airway remodeling. Airway smooth muscle." *Am J Respir Crit Care Med* **164**(10 Pt 2): S63-66.
- Boros, J., I. J. Donaldson, A. O'Donnell, Z. A. Odrowaz, L. Zeef, M. Lupien, C. A. Meyer, X. S. Liu, M. Brown and A. D. Sharrocks (2009). "Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery." *Genome Res* **19**(11): 1963-1973.
- Buchwalter, G., C. Gross and B. Wasylyk (2004). "Ets ternary complex transcription factors." *Gene* **324**: 1-14.

- Camoretti-Mercado, B., N. O. Dulin and J. Solway (2003). "Serum response factor function and dysfunction in smooth muscle." Respir Physiol Neurobiol **137**(2-3): 223-235.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2004). Biologie. St-Laurent, Québec, ERPI.
- Carson, J. A., R. A. Fillmore, R. J. Schwartz and W. E. Zimmer (2000). "The smooth muscle gamma-actin gene promoter is a molecular target for the mouse bagpipe homologue, mNkx3-1, and serum response factor." J Biol Chem **275**(50): 39061-39072.
- Chai, J., D. Baatar and A. Tarnawski (2004). "Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing." Gastroenterology **126**(7): 1809-1818.
- Chai, J., M. Norng, A. S. Tarnawski and J. Chow (2007). "A critical role of serum response factor in myofibroblast differentiation during experimental oesophageal ulcer healing in rats." Gut **56**(5): 621-630.
- Chai, J. and A. S. Tarnawski (2002). "Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing." J Physiol Pharmacol **53**(2): 147-157.
- Chang, D. F., N. S. Belaguli, D. Iyer, W. B. Roberts, S. P. Wu, X. R. Dong, J. G. Marx, M. S. Moore, M. C. Beckerle, M. W. Majesky and R. J. Schwartz (2003). "Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors." Dev Cell **4**(1): 107-118.
- Chen, J., H. Chen, K. M. Sanders and B. A. Perrino (2008). "Regulation of SRF/CArG-dependent gene transcription during chronic partial obstruction of murine small intestine." Neurogastroenterol Motil **20**(7): 829-842.
- Chow, N., R. D. Bell, R. Deane, J. W. Streb, J. Chen, A. Brooks, W. Van Nostrand, J. M. Miano and B. V. Zlokovic (2007). "Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 823-828.
- Chung, K. F. (2008). Airway smooth muscle in asthma and COPD : biology and pharmacology. Chichester ; Hoboken, N.J., John Wiley & Sons, Ltd.
- Couetil, L. L. and M. P. Ward (2003). "Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999)." J Am Vet Med Assoc **223**(11): 1645-1650.
- Criqui-Filipe, P., C. Ducret, S. M. Maira and B. Wasylyk (1999). "Net, a negative Ras-switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de-acetylation." EMBO J **18**(12): 3392-3403.



- Croissant, J. D., J. H. Kim, G. Eichele, L. Goering, J. Lough, R. Prywes and R. J. Schwartz (1996). "Avian serum response factor expression restricted primarily to muscle cell lineages is required for alpha-actin gene transcription." Dev Biol **177**(1): 250-264.
- Cunningham, J. G. and B. G. Klein (2007). Textbook of veterinary physiology. St. Louis, Mo., Saunders/Elsevier, p. 572-573.
- Dalton, S. and R. Treisman (1992). "Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element." Cell **68**(3): 597-612.
- Dekkers, B. G., D. Schaafsma, S. A. Nelemans, J. Zaagsma and H. Meurs (2007). "Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(6): L1405-1413.
- Derksen, F. J., N. E. Robinson, J. S. Scott and J. A. Stick (1988). "Aerosolized *Micropolyspora faeni* antigen as a cause of pulmonary dysfunction in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)." Am J Vet Res **49**(6): 933-938.
- Ding, W., S. Gao and R. E. Scott (2001). "Senescence represses the nuclear localization of the serum response factor and differentiation regulates its nuclear localization with lineage specificity." J Cell Sci **114**(Pt 5): 1011-1018.
- Drewett, V., A. Devitt, J. Saxton, N. Portman, P. Greaney, N. E. Cheong, T. F. Alnemri, E. Alnemri and P. E. Shaw (2001). "Serum response factor cleavage by caspases 3 and 7 linked to apoptosis in human BJAB cells." J Biol Chem **276**(36): 33444-33451.
- Franchini, M., U. Gill, R. von Fellenberg and V. D. Bracher (2000). "Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay." Am J Vet Res **61**(11): 1369-1374.
- Franchini, M., U. Gilli, M. K. Akens, R. V. Fellenberg and V. Bracher (1998). "The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." Vet Immunol Immunopathol **66**(1): 53-65.
- Furness, M. C., D. Bienzle, J. L. Caswell, J. Delay and L. Viel (2010). "Immunohistochemical identification of collagen in the equine lung." Vet Pathol **47**(5): 982-990.
- Gauthier-Rouviere, C., J. C. Cavadore, J. M. Blanchard, N. J. Lamb and A. Fernandez (1991). "p67SRF is a constitutive nuclear protein implicated in the modulation of genes required throughout the G1 period." Cell Regul **2**(7): 575-588.

- Gerber, V., D. Baleri, J. Klukowska-Rotzler, J. E. Swinburne and G. Dolf (2009). "Mixed inheritance of equine recurrent airway obstruction." J Vet Intern Med **23**(3): 626-630.
- Gerber, V., A. Lindberg, C. Berney and N. E. Robinson (2004). "Airway mucus in recurrent airway obstruction--short-term response to environmental challenge." J Vet Intern Med **18**(1): 92-97.
- Giguere, S., L. Viel, E. Lee, R. J. MacKay, J. Hernandez and M. Franchini (2002). "Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate." Vet Immunol Immunopathol **85**(3-4): 147-158.
- Grueneberg, D. A., S. Natesan, C. Alexandre and M. Z. Gilman (1992). "Human and Drosophila homeodomain proteins that enhance the DNA-binding activity of serum response factor." Science **257**(5073): 1089-1095.
- Hassler, M. and T. J. Richmond (2001). "The B-box dominates SAP-1-SRF interactions in the structure of the ternary complex." EMBO J **20**(12): 3018-3028.
- Haveri, H., M. Ashorn, S. Iltanen, D. B. Wilson, L. C. Andersson and M. Heikinheimo (2009). "Enhanced expression of transcription factor GATA-4 in inflammatory bowel disease and its possible regulation by TGF-beta1." J Clin Immunol **29**(4): 444-453.
- Hendrix, J. A., B. R. Wamhoff, O. G. McDonald, S. Sinha, T. Yoshida and G. K. Owens (2005). "5' CARG degeneracy in smooth muscle alpha-actin is required for injury-induced gene suppression in vivo." J Clin Invest **115**(2): 418-427.
- Herring, B. P., A. M. Kriegel and A. M. Hoggatt (2001). "Identification of Barx2b, a serum response factor-associated homeodomain protein." J Biol Chem **276**(17): 14482-14489.
- Herszberg, B., D. Ramos-Barbon, M. Tamaoka, J. G. Martin and J. P. Lavoie (2006). "Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling." J Allergy Clin Immunol **118**(2): 382-388.
- Hoffmann, R. and G. S. Mintz (2000). "Coronary in-stent restenosis - predictors, treatment and prevention." Eur Heart J **21**(21): 1739-1749.
- Hotchkiss, J. W., S. W. Reid and R. M. Christley (2007). "A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction." Equine Vet J **39**(4): 301-308.
- Jakkaraju, S., X. Zhe and L. Schuger (2003). "Role of stretch in activation of smooth muscle cell lineage." Trends Cardiovasc Med **13**(8): 330-335.

- James, A. L., J. G. Elliot, R. L. Jones, M. L. Carroll, T. Mauad, T. R. Bai, M. J. Abramson, K. O. McKay and F. H. Green (2012). "Airway Smooth Muscle Hypertrophy and Hyperplasia in Asthma." Am J Respir Crit Care Med.
- James, A. L., J. C. Hogg, L. A. Dunn and P. D. Pare (1988). "The use of the internal perimeter to compare airway size and to calculate smooth muscle shortening." Am Rev Respir Dis **138**(1): 136-139.
- James, A. L., P. D. Pare and J. C. Hogg (1989). "The mechanics of airway narrowing in asthma." Am Rev Respir Dis **139**(1): 242-246.
- Jean, D., A. Vrins and J. P. Lavoie (1999). "Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Vet Res **60**(11): 1341-1346.
- Jost, U., J. Klukowska-Rotzler, G. Dolf, J. E. Swinburne, A. Ramseyer, M. Bugno, D. Burger, S. Blott and V. Gerber (2007). "A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses." Equine Vet J **39**(3): 236-241.
- Katavolos, P., C. A. Ackerley, L. Viel, M. E. Clark, X. Wen and D. Bienzle (2009). "Clara cell secretory protein is reduced in equine recurrent airway obstruction." Vet Pathol **46**(4): 604-613.
- Kaup, F. J., W. Drommer, S. Damsch and E. Deegen (1990). "Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region." Equine Vet J **22**(5): 349-355.
- Kemp, P. R. and J. C. Metcalfe (2000). "Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity." Biochem J **345 Pt 3**: 445-451.
- Kim, B. M., G. Buchner, I. Miletich, P. T. Sharpe and R. A. Shivdasani (2005). "The stomach mesenchymal transcription factor Barx1 specifies gastric epithelial identity through inhibition of transient Wnt signaling." Dev Cell **8**(4): 611-622.
- Klukowska-Rotzler, J., J. E. Swinburne, C. Drogemuller, G. Dolf, J. Janda, T. Leeb and V. Gerber (2012). "The interleukin 4 receptor gene and its role in recurrent airway obstruction in Swiss Warmblood horses." Anim Genet **43**(4): 450-453.
- Knoll, B. and A. Nordheim (2009). "Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm." Trends Neurosci **32**(8): 432-442.
- Lanctot Setlakwe, E. (2011). Subepithelial collagen content in the peripheral airways of heaves-affected horses and controls. Master without article, University of Montreal.
- Lavoie, J. P., K. Maghni, M. Desnoyers, R. Taha, J. G. Martin and Q. A. Hamid (2001). "Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is

- characterized by a Th2-type cytokine profile." Am J Respir Crit Care Med **164**(8 Pt 1): 1410-1413.
- Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux, E. Gelinias-Lymburner, F. David, J. G. Martin and J. P. Lavoie (2011). "Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(1): 181-187.
- Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux, P. Joubert, F. Relave, E. L. Setlakwe, G. Beauchamp, C. Couture, J. G. Martin and J. P. Lavoie (2012). "Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(5): 589-596.
- Leclere, M., A. Lavoie-Lamoureux and J. P. Lavoie (2011). "Heaves, an asthma-like disease of horses." Respirology **16**(7): 1027-1046.
- Leguillette, R. (2003). "Recurrent airway obstruction--heaves." Vet Clin North Am Equine Pract **19**(1): 63-86, vi.
- Li, H. J., C. Q. Zhang, C. X. Yu, F. Liu, Q. L. Gai, J. X. Wu, J. P. Zhao and L. Dong (2012). "[Roles of Th17 lymphocytes and inflammatory cytokines in airway inflammation exacerbation of murine asthmatic model]." Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi **28**(11): 1126-1128.
- Li, S., D. Z. Wang, Z. Wang, J. A. Richardson and E. N. Olson (2003). "The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9366-9370.
- Maira, S. M., J. M. Wurtz and B. Wasylyk (1996). "Net (ERP/SAP2) one of the Ras-inducible TCFs, has a novel inhibitory domain with resemblance to the helix-loop-helix motif." EMBO J **15**(21): 5849-5865.
- Marr, K. A., A. P. Foster, P. Lees, F. M. Cunningham and C. P. Page (1997). "Effect of antigen challenge on the activation of peripheral blood neutrophils from horses with chronic obstructive pulmonary disease." Res Vet Sci **62**(3): 253-260.
- Marr, K. A., P. Lees and F. M. Cunningham (2002). "Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease." Equine Vet J **34**(1): 65-70.
- Matera, M. G., M. Amorena and A. Lucisano (2002). "Innervation of equine airways." Pulm Pharmacol Ther **15**(6): 503-511.
- McGorum, B. C., J. Ellison and R. T. Cullen (1998). "Total and respirable airborne dust endotoxin concentrations in three equine management systems." Equine Vet J **30**(5): 430-434.
- McPherson, E. A., G. H. Lawson, J. R. Murphy, J. M. Nicholson, R. G. Breeze and H. M. Pirie (1979). "Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses:

- aetiological studies: responses to intradermal and inhalation antigenic challenge." Equine Vet J **11**(3): 159-166.
- Miano, J. M., X. Long and K. Fujiwara (2007). "Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C70-81.
- Miletich, I., G. Buchner and P. T. Sharpe (2005). "Barx1 and evolutionary changes in feeding." J Anat **207**(5): 619-622.
- Mitchell, R. W., A. J. Halayko, S. Kahraman, J. Solway and M. E. Wylam (2000). "Selective restoration of calcium coupling to muscarinic M(3) receptors in contractile cultured airway myocytes." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(5): L1091-1100.
- Munakata, M. (2006). "Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma." Allergol Int **55**(3): 235-243.
- Nishida, W., M. Nakamura, S. Mori, M. Takahashi, Y. Ohkawa, S. Tadokoro, K. Yoshida, K. Hiwada, K. Hayashi and K. Sobue (2002). "A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes." J Biol Chem **277**(9): 7308-7317.
- Norris, R. A., K. K. Scott, C. S. Moore, G. Stetten, C. R. Brown, E. W. Jabs, E. A. Wulfsberg, J. Yu and M. J. Kern (2000). "Human PRRX1 and PRRX2 genes: cloning, expression, genomic localization, and exclusion as disease genes for Nager syndrome." Mamm Genome **11**(11): 1000-1005.
- Owens, G. K., M. S. Kumar and B. R. Wamhoff (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Ozier, A., B. Allard, I. Bara, P. O. Girodet, T. Trian, R. Marthan and P. Berger (2011). "The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology." J Allergy (Cairo) **2011**: 742710.
- Parmacek, M. S. (2008). "Myocardin: dominant driver of the smooth muscle cell contractile phenotype." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(8): 1416-1417.
- Pipes, G. C., E. E. Creemers and E. N. Olson (2006). "The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis." Genes Dev **20**(12): 1545-1556.
- Pirie, R. S., P. M. Dixon and B. C. McGorum (2003). "Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses." Clin Exp Allergy **33**(9): 1289-1296.
- Potthoff, M. J. and E. N. Olson (2007). "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." Development **134**(23): 4131-4140.

- Range, F., L. Mundhenk and A. D. Gruber (2007). "A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction." Vet Pathol **44**(6): 901-911.
- Relave, F., F. David, M. Leclere, K. Alexander, G. Bussieres, J. P. Lavoie and M. Marcoux (2008). "Evaluation of a thoracoscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses." Vet Surg **37**(3): 232-240.
- Robinson, N. E. (2001). "International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000." Equine Vet J **33**(1): 5-19.
- Robinson, N. E., F. J. Derksen, M. A. Olszewski and V. A. Buechner-Maxwell (1996). "The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses." Br Vet J **152**(3): 283-306.
- Sagave, J. F., M. Moser, E. Ehler, S. Weiskirchen, D. Stoll, K. Gunther, R. Buttner and R. Weiskirchen (2008). "Targeted disruption of the mouse *Csrp2* gene encoding the cysteine- and glycine-rich LIM domain protein CRP2 result in subtle alteration of cardiac ultrastructure." BMC Dev Biol **8**: 80.
- Sasse, H. H. L. (1971). Some Pulmonary Function Tests in Horses: An Aid to an Early Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (heaves) in Horses, Bronder-Offset.
- Schlesinger, J., M. Schueler, M. Grunert, J. J. Fischer, Q. Zhang, T. Krueger, M. Lange, M. Tonjes, I. Dunkel and S. R. Sperling (2011). "The cardiac transcription network modulated by *Gata4*, *Mef2a*, *Nkx2.5*, *Srf*, histone modifications, and microRNAs." PLoS Genet **7**(2): e1001313.
- Tremblay, G. M., C. Ferland, J. M. Lapointe, A. Vrins, J. P. Lavoie and Y. Cormier (1993). "Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses." Equine Vet J **25**(3): 194-197.
- van der Haegen, A., F. Kunzle, V. Gerber, M. Welle, N. E. Robinson and E. Marti (2005). "Mast cells and IgE-bearing cells in lungs of RAO-affected horses." Vet Immunol Immunopathol **108**(3-4): 325-334.
- Verzi, M. P., M. N. Stanfel, K. A. Moses, B. M. Kim, Y. Zhang, R. J. Schwartz, R. A. Shivdasani and W. E. Zimmer (2009). "Role of the homeodomain transcription factor *Bapx1* in mouse distal stomach development." Gastroenterology **136**(5): 1701-1710.
- Wang, D. Z. and E. N. Olson (2004). "Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators." Curr Opin Genet Dev **14**(5): 558-566.

- Warren, J. B., S. J. Jennings and T. J. Clark (1984). "Effect of adrenergic and vagal blockade on the normal human airway response to exercise." Clin Sci (Lond) **66**(1): 79-85.
- Werth, D., G. Grassi, N. Konjer, B. Dapas, R. Farra, C. Giansante, R. Kandolf, G. Guarnieri, A. Nordheim and O. Heidenreich (2010). "Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor." Eur J Cell Biol **89**(2-3): 216-224.
- West, J. B. (1985). Respiratory physiology--the essentials. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 108.
- Wheater, P. R., B. Young and J. W. Heath (2001). Histologie fonctionnelle. Paris, De Boeck Université.
- Wiggs, B. R., R. Moreno, J. C. Hogg, C. Hilliam and P. D. Pare (1990). "A model of the mechanics of airway narrowing." J Appl Physiol **69**(3): 849-860.
- Woods, P. S., N. E. Robinson, M. C. Swanson, C. E. Reed, R. V. Broadstone and F. J. Derksen (1993). "Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems." Equine Vet J **25**(3): 208-213.
- Wu, W., X. Huang, J. Cheng, Z. Li, S. de Folter, Z. Huang, X. Jiang, H. Pang and S. Tao (2011). "Conservation and evolution in and among SRF- and MEF2-type MADS domains and their binding sites." Mol Biol Evol **28**(1): 501-511.
- Yang, Y., S. Beqaj, P. Kemp, I. Ariel and L. Schuger (2000). "Stretch-induced alternative splicing of serum response factor promotes bronchial myogenesis and is defective in lung hypoplasia." J Clin Invest **106**(11): 1321-1330.
- Yin, F. and B. P. Herring (2005). "GATA-6 can act as a positive or negative regulator of smooth muscle-specific gene expression." J Biol Chem **280**(6): 4745-4752.
- Yu, M. F., Z. W. Wang, N. E. Robinson and F. J. Derksen (1994). "Modulation of bronchial smooth muscle function in horses with heaves." J Appl Physiol **77**(5): 2149-2154.
- Zhou, J., G. Hu and B. P. Herring (2005). "Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1." Mol Cell Biol **25**(22): 9874-9885.

## **ANNEXE A**



## Protocole d'extraction des protéines

### Matériel:

- Polytron PowerGen 125 (Fisher) avec la sonde 3850
- Balance
- Eau milipore
- Tissu à extraire
- Bac de glace
- T-Per®, Réactif d'extraction des protéines des tissus, Thermo scientific
- Inhibiteurs de phosphatases
- Inhibiteurs de protéases
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre
- BSA (Albumine du sérum bovin)

1. Nettoyer la sonde du polytron en la rinçant dans de l'eau milipore à haute vitesse, puis l'essuyer
2. Prendre 200mg de tissu, soit peser 0,20g de tissu, et le placer dans un tube de 14ml
3. Ajouter les solutions suivantes pour obtenir un volume total de 2ml
  - a. 1600 µl de T-Per
  - b. 200 µl d'inhibiteurs de phosphatases
  - c. 200 µl d'inhibiteurs de protéases
4. Homogénéiser le mélange au polytron de manière à obtenir un liquide
5. Placer le mélange sur la glace
6. Nettoyer la sonde en retirant les débris à l'aide de pinces si nécessaire, puis en la rinçant dans de l'eau milipore à haute vitesse
7. Répéter les étapes 2 à 6 pour les échantillons de tissus subséquents
8. Centrifuger les échantillons à 5000 rpm pour 5 min de manière à ce qu'un culot se forme et que les débris ne soient plus en suspension
9. Recueillir le surnageant et les séparer en aliquots (donne environ 4 aliquots de 500 µl)
10. Placer les aliquots au congélateur à -70°C, conserver un échantillon de chaque tissu pour la quantification.

### Quantification des protéines par spectrophotomètre (courbe de Bradford)

1. Préparer un tube de référence contenant 1,5ml de saline et un second contenant 100  $\mu$ l de saline et 1ml de BSA
2. Les tubes étaient répartis comme suit :
  - a. Tube de référence
  - b. BSA
  - c. 1  $\mu$ l d'extrait du tissu 1 + 99  $\mu$ l de saline + 1mL BSA
  - d. 2  $\mu$ l d'extrait du tissu 1 + 98  $\mu$ l de saline + 1mL BSA
  - e. Répéter les étapes c et d pour les tissus subséquents
3. Laisser agir 1 min et demi, puis lire les échantillons. On obtient l'absorption et la concentration pour chaque concentration du tissu
4. Par la suite, calculer le nombre de millilitre pour 100  $\mu$ g et 200  $\mu$ g pour chaque échantillon

## **ANNEXE B**

# Protocole Western Blot

## 1. SDS-PAGE

### 1) Assemblage de l'appareil

- 1- Avant de débiter, inspecter les vitres. Le dessous ne doit pas être abîmé.
- 2- Enlever les sels en passant les vitres sous l'eau courante.
- 3- Nettoyer les vitres à l'alcool, essuyer avec un papier essuie-tout.
- 4- Mettre la silicone (Sigmacotte®, conservé à 4°C) sur une des deux vitres.
- 5- Essuyer le surplus.
- 6- Assemblage
  - a. Il y a possibilité de faire 2 gels à la fois.
  - b. Mettre un peu de graisse (vacuum grease) dans le fond du plateau.
  - c. Mettre les traverses de chaque côté d'une des plaques de verre (s'assurer d'avoir les traverses qui vont avec le peigne que l'on veut utiliser).
  - d. Déposer l'autre vitre par-dessus.
  - e. Placer les montants de chaque côté des vitres et s'assurer que le montage est bien fait (les montants doivent être égaux avec la vitre du fond).
  - f. Serrer les vitres avec les vis (en haut et en bas suffit), mais attention de ne pas trop visser (une fois qu'on sent la tension faire seulement  $\frac{1}{4}$  tour).
  - g. Déposer le montage sur le fond préalablement graissé.
  - h. Mettre une petite pression et enclencher les *clips* noirs (en bas).

### 2) Préparation du gel de séparation

- 1- Usage de solutions stocks conservées à 4°C.
- 2- Ajouter les produits dans l'ordre du tableau (voir tableau plus bas).
- 3- Une fois le TEMED ajouté, la polymérisation est amorcée, ne pas trop attendre.
- 4- Bien mélanger pour que la polymérisation soit égale partout.
- 5- Avant de couler le gel, marquer sur la vitre un trait à 11.5 cm.
- 6- Couler le gel avec une pipette de 10 ml. S'assurer que le liquide se rend jusqu'au fond et qu'il n'y a pas de bulles.
- 7- Vider le surplus dans un flacon (permet de suivre la polymérisation).
- 8- Laisser polymériser au moins 1 heure.
- 9- Mettre doucement 3 à 4 mm de butanol sur le gel avec une petite seringue (permet d'obtenir un bon front de migration).

**NOTE** : Si on laisse polymériser toute la nuit mettre une cellophane.

**NOTE** : S'il y des bulles sur le côté on les laisse faire, si elles sont dans le gel on peut cogner délicatement sur les vitres pour les faire sortir.



Concentration finale des tampons:   Stacking 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8  
  Separating 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8  
  Réservoir 0.025M Tris, 0.192 M glycine, pH 8.3, 0.75% SDS

\*L'APS doit être fait frais, on le garde 1 ½ semaine dans le frigo (on fait 10 ml à la fois)

\*Le gel de 10% est parfait pour un premier essai

\*Le gel de 20% est très concentré, peut causer problème

\*Le SDS est chargé – les protéines migrent donc vers le bas, il peut cependant être problématique si la protéine est déjà chargée – (elle ne migrera pas à son poids moléculaire)

### **3) Préparation du Stacking gel**

- 1- Enlever le butanol avec la petite seringue, on peut conserver le butanol.
- 2- Bien nettoyer le peigne avant utilisation.
- 3- Préparer le Stacking gel en ajoutant les solutions dans l'ordre du tableau ci-dessus.
- 4- Couler le Stacking gel avec une pipette, mettre le peigne et rajouter du Stacking gel pour bien remplir les espaces.
- 5- Laisser polymériser au moins 1 heure.
- 6- Verser le surplus dans un flacon, pour pouvoir suivre la polymérisation.

### **4) Préparation des échantillons**

- 1- Dégeler les échantillons désirés et les conserver sur glace.
- 2- Ne pas passer l'échantillon au vortex.
- 3- Mélanger avec le tampon de chargement (2X, donc pour 10µl de protéines ajouter 5µl de tampon) (on met entre 200µg et 100µg de protéines sur le gel).
- 4- Chauffer les échantillons 100°C 5 minutes et les remettre sur la glace.
- 5- Préparer l'échelle de poids moléculaire (PIERCE). Ajouter 10µl H<sub>2</sub>O par tube et laisser solubiliser.

**NOTE** : pour les gros peignes mettre 2 poids moléculaire par puits.

### 5) Chargement des échantillons

- 1- Vérifier la polymérisation du Stacking gel.
- 2- Enlever le peigne délicatement, l'essuyer et le ranger.
- 3- Rincer délicatement les puits avant de charger les échantillons.
  - a. Placer la partie supérieure de l'appareil sur les gels. S'assurer que les caoutchoucs noirs sont bien installés.
  - b. Défaire les clips noirs à la base des gels et les mettre sur la partie supérieure de l'appareil.
  - c. Enlever la base et déposer le montage sur un papier absorbant.
  - d. Marquer la base des puits sur les vitres.
  - e. Mettre le tampon de migration dans le bac supérieur, s'assurer qu'il n'y a pas de fuites.
  - f. Rincer tous les puits doucement avec du tampon de migration.
- 4- Installer le gel dans l'appareil.
  - a. Mettre un barreau magnétique dans le fond de l'appareil.
  - b. Remplir le fond de l'appareil avec du tampon de chargement jusqu'au tiers du gel.
  - c. Rincer doucement le dessous du gel pour enlever les bulles à l'aide d'une seringue.
- 5- Charger les échantillons.
  - a. Rincer la pipette 3 fois avant de prendre l'échantillon et le déposer tranquillement dans le puits.
  - b. Rincer la pipette entre chaque échantillon (3X).
  - c. Pour l'échelle de poids moléculaire s'assurer d'avoir la bonne quantité.  
Note : Pour les gros peignes, utiliser deux tubes de poids par puits.
- 6- Brancher l'appareil à  $V=25$  et  $mA=10$ .
- 7- Partir l'agitation.
- 8- Laisser migrer toute la nuit.
- 9- Le lendemain augmenter la vitesse de migration à  $V=150$ .

### 6) Solutions

a. Acrylamide (30:0.8)		
Acrylamide	60 g	150 g
Bis acrylamide	1.6 g	4 g
H <sub>2</sub> O	200mL	500mL

Pour un volume total: 200 ml                      500 ml

Dissoudre dans l'H<sub>2</sub>O et ajuster le volume jusqu'à 200 ml puis filtrer avec un papier Whatman No.1. Garder à la noirceur à 4°C.

Note : L'acrylamide est neurotoxique, utiliser avec soin.

b. Separating gel (1.5M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris    18.2 g

H<sub>2</sub>O    100 ml

Dissoudre dans environ 80 ml d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le pH à 8.8 et compléter le volume jusqu'à 100 ml. Filtrer avec un papier Whatman No.1. Se conserve à 4°C.

c. Stacking gel (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris    6 g

H<sub>2</sub>O    100 ml

Dissoudre dans environ 80 ml d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le pH à 6.8 et compléter le volume jusqu'à 100 ml. Filtrer avec un papier Whatman No.1. Se conserve à 4°C.

d. Solution de coloration

Coomassie Brilliant Blue R250                      0.4 g

Trichloro Acetic acid (TCA)                      10 g

Acide acétique glacial                      70 ml

Méthanol                      500 ml

H<sub>2</sub>O                      jusqu'à 1 litre



Dissoudre le colorant Coomassie dans le méthanol d'abord, puis ajouter l'acide et l'eau. Le colorant est plus efficace à la première utilisation, mais peut être utilisé plusieurs fois. Par contre, son efficacité diminue.

e. Solution de décoloration

Méthanol	230 ml	115 ml
Acide acétique glacial	70 ml	35 ml
H <sub>2</sub> O	700 ml	350 ml
Volume total:	1 litre	500 ml

f. Tampon de chargement

	1X	2X
0.5M Tris HCl, pH 6.8	1.25 ml	2.5 ml
Glycérol	1 ml	2 ml
10% SDS	1 ml	2 ml
B-mercaptoethanol	0.4 ml	0.8 ml
0.5% Bromophenol Blue	0.05 gr	0.4 ml
H <sub>2</sub> O	jusqu'à 10 ml	jusqu'à 10 ml

Mélanger le tampon de chargement 1:1 (v/v) avec l'échantillon. Le tampon de chargement peut être utilisé en 2X afin de réduire le volume d'échantillon à appliquer sur le gel.

g. 10X tampon de réservoir (pH 8.3)

Tris	30 g (0.25 M)
Glycine	108 g (1.92 M)
SDS	7.5 g (0.75%)
H <sub>2</sub> O	compléter à 1 litre

La solution devrait être à pH 8.3 sans ajustement. Entreposer la solution à température pièce.

#### NOTES:

1. Pour une polymérisation optimale, réaliser le gel de séparation une journée avant la suite du protocole. Ajouter du butanol saturé d'eau à la surface du gel de séparation afin de réaliser un gel uniforme et prévenir la dessiccation du gel durant la nuit. Enlever le butanol avant de couler le stacking gel.
2. Les échantillons sont dissouts dans le tampon de chargement puis chauffé à 100°C pendant 5 min. Déposer sur la glace, centrifuger et charger sur le gel.
3. Le colorant de Coomassie Brillant Blue R250 colore les protéines et détecte celles-ci jusqu'à 0.1 à 1 µg. Produit une bande d'environ de 1 cm d'épaisseur.

#### 7) Référence

Dunn, M.J. *Gel electrophoresis: proteins. Introduction to biotechniques series*, 1993, Bios Scientific Publishers Ltd., 176P.

## 2. Transfert sur nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide suivi de leur immunodétection

### 1) Transfert des protéines sur la membrane.

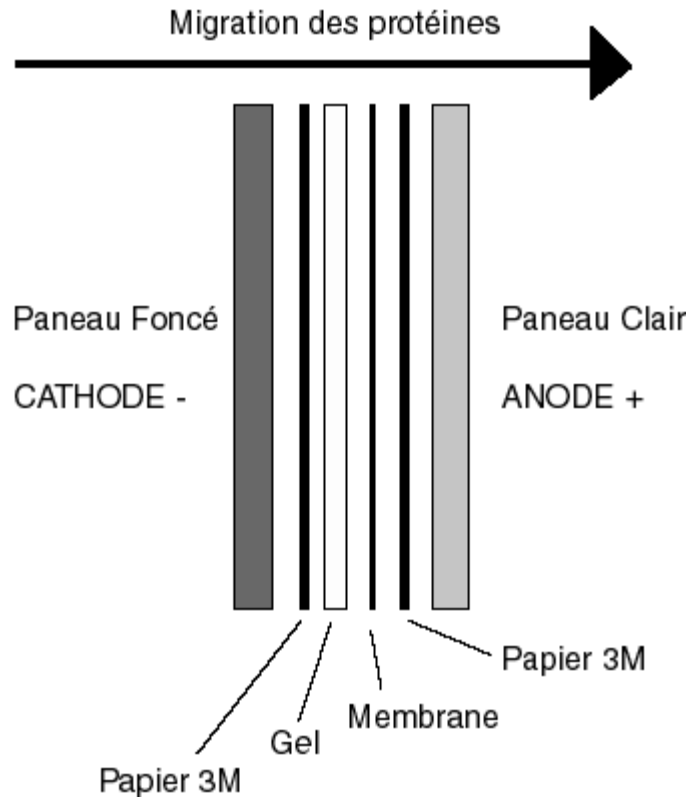
- a. Lavage du gel et préparation de la membrane.
  - Tremper le gel dans le tampon de transfert 15 à 30 minutes (permet de se débarrasser des sels et du SDS).
  - Laisser tremper 1 heure si l'épaisseur du gel est > 2mm.
  - Couper la membrane de la grandeur du gel.
  - Tremper la membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert 15 à 30 minutes.
  - Si on utilise une membrane de PVDF, l'humecter avec du méthanol et par la suite la laisser tremper dans le tampon de transfert.
  - Couper deux papiers 3M de la grandeur de l'appareil de transfert et les humecter dans le tampon de transfert ainsi que les grilles de transfert.

**NOTE :** Pour faciliter l'identification du côté de la membrane portant les protéines, couper un coin de la membrane. Le coin coupé, lorsque situé dans le

coin inférieur gauche, indique que la surface portant les protéines est sur le dessus.

b. Montage de l'appareil de transfert.

- Remplir la cuve avec 400ml de tampon de transfert froid et mettre le barreau magnétique.
- Voir le schéma ci-dessous pour un schéma du montage.



- Les protéines migreront vers l'anode positive.
- Faire le montage en s'assurant de ne pas emprisonner de bulles et de ne pas dépasser du cadre imposé.
- Installer le montage de transfert dans la cuve.
- Recouvrir de tampon de transfert froid (volume total de 650ml, couvrir les ouvertures des panneaux).
- Amener l'appareil dans la chambre froide, le déposer sur la plaque agitatrice et démarrer l'agitation du barreau.
- Faire migrer toute la nuit à 20 V à 4°C (ou 30 V max, 40mA) (ou 4h à 70 V à 4°C)

**NOTE** : Après cette étape, la membrane peut être conservée quelques semaines dans du TBS pH 7.5

**2) Révélation de bandes protéiques spécifiques à l'aide d'anticorps polyclonaux.**

a. Blocage des sites non-spécifiques.

- Défaire le montage de transfert en prenant soin de faire des trous à l'aide d'une aiguille pour marquer l'échelle de poids moléculaire.
- S'assurer de garder les protéines sur le dessus et que la membrane ne sèche pas.
- Rincer trois fois la membrane pour une minute chaque dans le TBS pH 7.5 en soulevant la membrane (utiliser un plat plastique de la grandeur de la membrane).
- Ajouter la solution de blocage choisie : TBS pH 7.5 + 0.1% Tween 20 + 5% lait écrémé en poudre (ou TBS + 0.1% Tween 20 + 10% sérum veau fœtal),
- Remettre le couvercle.
- Incuber pendant 2 heures sur une plaque agitatrice à température pièce.

**NOTE** : Ne pas ajouter d'azide de sodium car il inhibe la peroxydase.

**NOTE** : Durant l'incubation, préparer la solution d'anticorps primaire. Diluer l'anticorps primaire à concentration appropriée dans une solution de blocage non-utilisée.

**NOTE** : La solution de blocage peut être récupérée et réutilisée jusqu'à un maximum de trois fois. À conserver au congélateur.

b. Incubation avec l'anticorps primaire

- Laver la membrane trois fois pendant 5 minutes chaque dans du TBS pH 7.5.
- Ajouter la solution contenant l'anticorps primaire à la dilution appropriée (généralement entre 1 :200 et 1 : 10 000).
- Incuber toute la nuit à 4°C, avec le couvercle.
- Laver la membrane quatre fois pendant 5 minutes chaque dans le TBS Tween.

**NOTE** : Après cette étape, la membrane peut être conservée quelques semaines dans du TBS pH 7.5.

**NOTE** : La solution d'anticorps primaire peut être récupérée et réutilisée jusqu'à un maximum de trois fois. À conserver au congélateur.

**NOTE** : Ajouter un volume de solution d'environ 10 ml par 15 X 15 cm de membrane.

**NOTE** : Il est nécessaire de titrer l'anticorps car il est possible de diminuer soit le bruit de fond ou la liaison non-spécifique en utilisant la dilution appropriée.

c. Incubation avec l'anticorps secondaire.

- Lors de l'incubation avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase, ne pas utiliser de solution contenant du sodium azide (NaN<sub>3</sub>) car il inhibe la peroxydase.
- Diluer l'anticorps secondaire dans une nouvelle solution de blocage (en général 1 : 20 000).
- Incuber la membrane pendant 2 heures à température pièce.
- Suite à l'incubation, laver la membrane quatre fois pour 10 minutes chaque dans une solution de TBS pH 7.5 seul.

**NOTE** : Après cette étape, la membrane peut être conservée quelques semaines dans du TBS pH 7.5

d. Révélation avec le substrat.

- Utiliser le système de détection ECL+ (conservé à 4°C)
- Les quantités de substrat à utiliser sont indiquées dans la fiche technique (2 ml et 50µl). Préparer un volume de 2ml pour une petite membrane.
- Déposer la membrane sur un acétate préalablement coupé à la taille de la membrane.
- Verser le substrat et couvrir d'un autre acétate coupé en évitant la formation des bulles.
- Incuber 5 minutes à température pièce.
- Laver la membrane avec du TBS pH7.5.
- Déposer la membrane entre deux nouveaux acétates coupés à la taille de la membrane et bien essuyer le surplus de liquide.
- Mettre un papier 3M dans le fond d'une cassette et y fixer les acétates contenant la membrane.
- Mettre un film radiographique par-dessus le montage dans une chambre noire.
- Laisser incuber environ 10 minutes et, dans la salle, tourner le film. Laisser incuber 1 minute. On obtient ainsi deux temps d'exposition pour une même membrane,
- Développer le film
- Réexposer la membrane au besoin.

**NOTE** : Il est aussi possible de voir les résultats au Storm. Mettre de l'eau sur la vitre, y déposer la membrane protéine sur la vitre et choisir l'option

«chemiluminescence» du Storm. Noter que la membrane ne peut pas être réexposée sur un film suite au Storm.

**NOTE** : Si l'anticorps secondaire est marqué à la phosphatase alcaline, utiliser le système de détection du protocole d'IHC

**NOTE** : Lors du développement de plusieurs membranes faire attention au positionnement dans la cassette. Ne pas tourner le film après 10 minutes si les membranes occupent tout le fond de la cassette, utiliser un autre film.

### 3) Solutions

Tampon de Transfert (protéine < 80 KDa)

25mM	Tris	3gr
192mM	Glycine	14.4gr
20% (v/v)	Méthanol	200ml

Compléter le volume à 1 litre avec H<sub>2</sub>O. Le pH de la solution devrait être à 8.3. Se conserver à 4°C.

Tampon de transfert (protéine 20 KDa à 400 KDa)

48mM	Tris	5gr
390mM	Glycine	29.3gr
0.1% (w/v)	SDS	1gr
20% (v/v)	Méthanol	200ml

Compléter le volume à 1 litre avec H<sub>2</sub>O et conserver à 4°C. Pour le transfert, mettre à 24 volts 1 hr, puis 84 volts toute la nuit. On perd la coloration des poids moléculaire avec ce tampon.

Tampon TBS pH 7.5

20mM	Tris	2.4gr	20ml	1M Tris pH 7.5
150mM	NaCl	8.8gr	50ml	3M NaCl

Ajuster le pH à 7.5                      Compléter le volume à 1 litre  
Compléter le volume à 1 litre avec H<sub>2</sub>O

TBS Tween 0.1%

200µl de Tween 20% dans 200ml de TBS pH 7.5

Couper le bout du tips pour pipeter le Tween

**4) Référence :**

Harlow E, Lane D. *Antibodies. A laboratory Manual*, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, P 471-510

Mierendorf R, Percy C, Young R. 1987. *Gene isolation by screening lambdaGT11 librairies with antibodies*. In: Guide to molecular cloning techniques. Methods in enzymology. Ed. S.L. Berger and A.R.Kimmel. P458-469

Nathan M, Robinson R. 1995. *Optomized immunoscreening of cDNA librairies*. FOCUS 17 (2): 49-52

## **ANNEXE C**



## Protocole d'immunofluorescence

(Modifié de «cell signaling Immunofluorescence protocol»)

### A. Solutions et réactifs

**NOTE:** Les solutions doivent être préparées avec de l'eau Milli-pore

1. **10X Saline de Phosphate tamponnée (PBS):** pour préparer 1L, ajouter 80g de chlorure de sodium (NaCl), 2g de chlorure de potassium (KCl), 14.4g de phosphate de sodium dibasique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) et 2.4g de phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à 1L d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le pH à 7.4.
  2. Xylène
  3. Éthanol, anhydrique dénaturé, grade histologique, 100% et 95%
  4. Eau distillée (dH<sub>2</sub>O)
  5. **Tampon de blocage:** pour préparer 25 mL, ajouter 2.5mL 10X PBS, 1.25mL de sérum normal de la même espèce que l'anticorps secondaire (eg. Sérum normal de chèvre) et 21.25 mL d'H<sub>2</sub>O. Bien mélanger. En mélangeant, ajouter 75 µL de Triton X-100 (100%).
  6. **Tampon de blocage sans sérum:** Pour préparer 25 ml, ajouter 2.5mL 10X PBS, 22.425 ml d'H<sub>2</sub>O, mélanger. En mélangeant, ajouter 75 µL Triton X-100 (100%).
  7. **Tampon 10 mM Citrate de Sodium:** Pour préparer 1L, ajouter 2.94 g de sel trisodium citrate de sodium dihydrate (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>•2H<sub>2</sub>O) à 1 L d'H<sub>2</sub>O. Ajuster le pH à 6.0.
  8. **1X PBS, salé (0.4M) (high salt PBS):** pour préparer 1L, ajouter 100mL de PBS 10X à 900 mL d'H<sub>2</sub>O. Ajouter 23.38 g de NaCl et mélanger.
  9. Anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (**1 :1000**)
    - Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG Highly cross-absorbed (A11037)
    - Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG Highly cross-absorbed (A11029)
- NOTE:** Lors de l'usage d'un anticorps, primaire ou secondaire, pour la première fois, titrer l'anticorps pour déterminer la dilution optimale offrant un signal le plus fort avec le moins de background pour un échantillon donné.
10. VECTASHIELD<sup>®</sup>, médium de montage avec DAPI, vector laboratories cat#H-1200
  11. Anticorps primaires
    - Anticorps polyclonal de lapin anti-SRF d'origine humaine, Santa Cruz (SC-335), lot#D1709, **1:250**
    - Anticorps monoclonal de souris anti-actin α smooth-muscle clone 1A4, fluide d'ascite, Sigma (A2547), **1:250**

### B. Préparation des spécimens

## I. Sections de paraffine (IF-P)

**IMPORTANT:** vérifier la section application de la fiche technique pour s'assurer que le produit est validé et approuvé pour un usage en immunofluorescence de section en paraffine.

Déparaffination/Réhydratation:

1. Incuber les sections dans trois lavages de xylène pour 5 minutes chacun.
2. Incuber les sections dans deux lavages d'éthanol 100% pour 10 minutes chacun.
3. Incuber les sections dans deux lavages d'éthanol 95% pour 10 minutes chacun.
4. Rincer les sections deux fois dans l'H<sub>2</sub>O milipore pour 5 minutes chacun.

Démasquage d'antigènes:

1. Placer les lames dans la solution tampon de citrate de sodium 10 mM à pH 6.0 à température pièce.
2. Amener les lames à ébullition dans la solution tampon en utilisant un bain d'eau et maintenir à 95-99°C pour 10 minutes. (mettre la plaque chauffante à 500 pour 30 minutes)
3. Laisser les lames refroidir pour for 30 minutes sur la paillasse.
4. Rincer les sections dans l'H<sub>2</sub>O milipore trois fois pour 5 minutes chacun.
5. Rincer les sections dans du PBS pour 5 minutes.
6. Procéder avec l'immunomarquage dans la section C.

## C. Immunomarquage

**NOTE:** Toutes les incubations subséquentes doivent être effectuées à température pièce, sauf indication contraire, dans une boîte humide étanche à la lumière pour prévenir le séchage et la décoloration du fluorochrome.

1. Sortir une lame à la fois du bain de PBS. Secouer l'excès de fluide de la lame. Toujours s'assurer qu'aucune section de la lame ne sèche.
2. Encercler les sections de tissu avec un crayon hydrophobique sur chaque lame.
3. Placer les lames dans la boîte humide étanche à la lumière et appliquer le Tampon de Blocage avec Sérum.
4. Bloquer les échantillons avec le Tampon de Blocage avec Sérum pour 60 minutes.
5. Durant la période de blocage, préparer le(s) anticorps primaire(s) en diluant, tel qu'indiqué sur la fiche technique du produit, l'anticorps primaire dans la solution Tampon de Blocage avec Sérum.
6. Aspirer la solution de blocage et appliquer l'anticorps primaire SRF.

**NOTE:** Pour un double marquage, chaque incubation avec chaque anticorps primaire s'effectue séparément.

7. Incuber «overnight» à 4°C.
8. Rincer trois fois dans le PBS pour 5 minutes chaque. (ou deux lavages de PBS pour 5 minutes suivit d'un lavage de 2 minutes dans du PBS high salt, puis

9. d'un lavage de 5 minute dans du PBS 1X).

**OPTION:** Pour décroître le background, rincer les lames dans du PBS high salt pour deux minutes entre le deuxième et le troisième rinçage de PBS. Cependant, cette procédure pourrait réduire le marquage spécifique de certains anticorps.

10. Secouer les lames et les placer dans la boîte humide étanche à la lumière.

11. Appliquer la solution diluée d'anticorps primaire  $\alpha$ -actin. (option : bloquer les spécimens une seconde fois avant d'appliquer le second anticorps primaire)

12. Incuber 1h à 37°C.

13. Rincer trois fois dans le PBS pour 5 minutes chaque ou deux fois dans du PBS pour 5 minutes chaque, une fois dans le PBS high salt pour 2 minutes et une fois dans le PBS pour 5 minutes.

**NOTE:** Lors le l'usage d'anticorps primaires directement conjugués avec des fluorochromes Alexa Fluor<sup>®</sup>, passer directement à l'étape C15.

14. Incuber les lames avec la solution d'anticorps secondaire conjugué à des fluorochromes diluée dans une solution Tampon de Blocage sans sérum pour 2 heures à température pièce dans le noir.

**NOTE:** Pour un double marquage, préparer un cocktail d'anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes à dilution appropriée dans le Tampon de Blocage sans Sérum.

15. Rincer les lames dans le PBS/PBS high salt tel que dans l'étape 8.

16. Enlever l'excès de liquide. Mettre 2 gouttes de Vectashield<sup>®</sup> sur les grosses sections de tissus, pour les plus petites sections mettre une goutte.

17. Couvrir l'échantillon avec une lamelle. S'assurer qu'il n'y a pas de bulles dans la solution Vectashield<sup>®</sup>. Délicatement essuyer l'excès de liquide.

18. Sceller les lames en couvrant les contours des lamelles avec du vernis à ongles.

19. Vectashield<sup>®</sup> ne polymérise pas. Pour un stockage à long terme, entreposer les lames à plat protégées de la lumière à -20°C.

## **ANNEXE D**

## **Protocole de prise de photo et de modification des images au microscope**

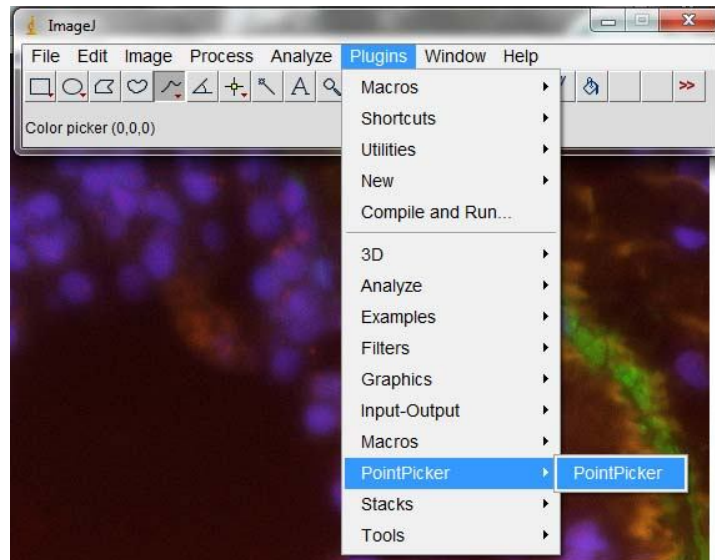
- 1- Trouver le champ à prendre en photo sur la lame.
- 2- Dans le menu de gauche, sélectionner l'onglet du DAPI.
- 3- Cliquer sur « mesure ».
- 4- Dans la fenêtre qui apparaît, centrer et refocuser l'image en regardant la fenêtre sur l'écran seulement.
- 5- Cliquer sur « ok ».
- 6- Sélectionner l'onglet de la rhodamine.
- 7- Dans la fenêtre qui apparaît, sélectionner le temps d'exposition désiré (10ms pour le SRF).
- 8- Cliquer sur « ok »
- 9- Sélectionner l'onglet du FITC.
- 10- Dans la fenêtre qui apparaît, sélectionner le temps d'exposition désiré (15ms pour l' $\alpha$ -actin).
- 11- Cliquer sur « ok ».
- 12- Dans le bas du menu de gauche, à droite, cliquer sur « start ».
- 13- Une image apparaît.
- 14- Dans le menu du bas de l'image, cliquer sur « on ». Il changera pour « off ».
- 15- À droite de cet icône, cliquer sur l'onglet bleu (1).
- 16- Faire glisser le curseur sur l'image, cliquer avec le bouton de droite de la souris.
- 17- Aller sélectionner « propriété ».
- 18- Aller cliquer sur le bouton « min/max ».
- 19- Sans quitter la fenêtre, aller sélectionner dans le bas de l'image l'onglet rouge (2).
- 20- Cliquer sur le bouton « min/max ».
- 21- Aller sélectionner l'onglet vert (3) et cliquer sur « min/max ».
- 22- Fermer la fenêtre « propriété »
- 23- Cliquer sur le bouton « off » dans le bas de l'image. On obtient l'image avec les trois couleurs.

## **ANNEXE E**

# Protocole de comptage de point et morphométrie avec Image J

## 1. Comptage des points

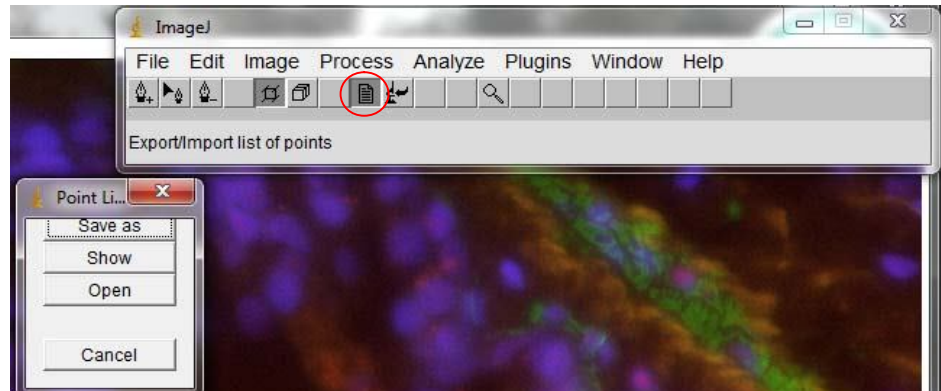
- 1.1. Obtenir le plugin « pointpicker » sur le site de ImageJ et l'installer
- 1.2. Ouvrir image J
- 1.3. Ouvrir l'image à analyser sous format JPG
- 1.4. Agrandir l'image au grossissement désiré
- 1.5. Aller dans le menu « Plugins »
- 1.6. Sélectionner l'option « pointpicker » dans le bas du menu



- 1.7. Sélectionner l'option « pointpicker » à nouveau
- 1.8. À l'aide du curseur en croix, sélectionner les noyaux bleus dans la portion verte (muscle lisse)
  - 1.8.1. En double cliquant sur le curseur de sélection, on peut choisir l'option monochrome. Cela fait en sorte que les croix soient toutes de la même couleur.



- 1.8.2. Pour obtenir le compte des croix, donc des noyaux, cliquer sur le bouton «export/import list of points». Sélectionner le bouton «show». Faire défiler la liste qui apparaît jusqu'en bas.

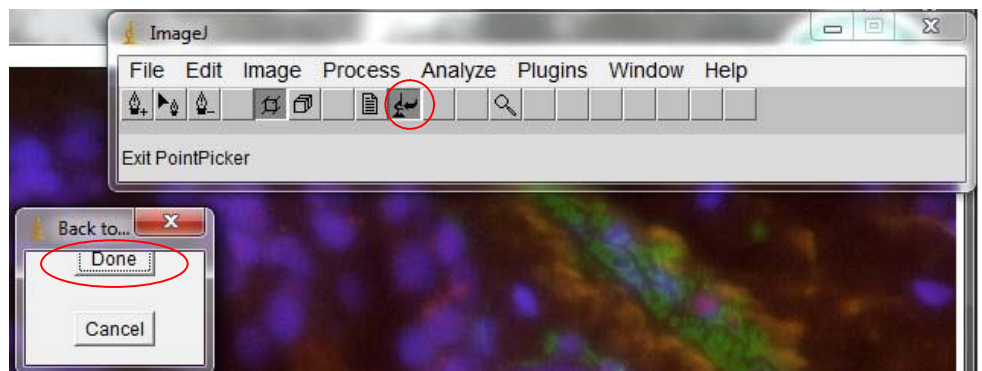


- 1.8.3. La liste qu'on obtient commence à compter à partir de zéro. Il faut donc ajouter un point de plus au compte de la colonne de gauche. On regarde le dernier chiffre de la liste sous la colonne «point».

- 1.9. Refaire les dernières manipulations, mais cette fois-ci en sélectionnant les noyaux rouges et bleus dans la portion verte

point	x	y	slice	color	id
0	1768	1334	1	0	7
1	1768	1334	1	1	8
2	1754	1384	1	2	9
3	1754	1385	1	3	10
4	1764	1388	1	4	11
5	1803	1474	1	5	12
6	1791	1492	1	6	13

- 1.10. Pour changer d'image ou si l'on veut déplacer l'image de gauche à droite, cliquer sur le bouton «exit pointpicker».

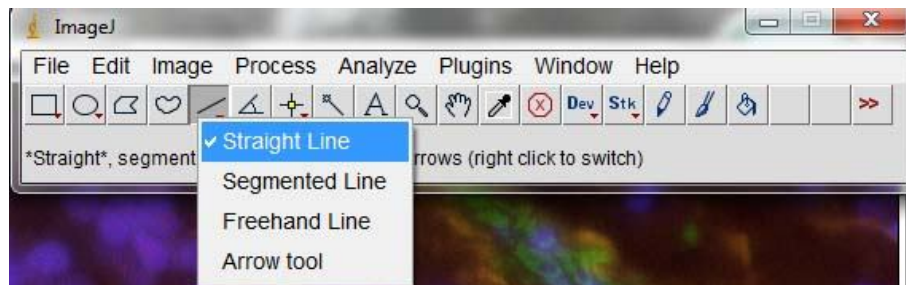




## 2. Morphométrie

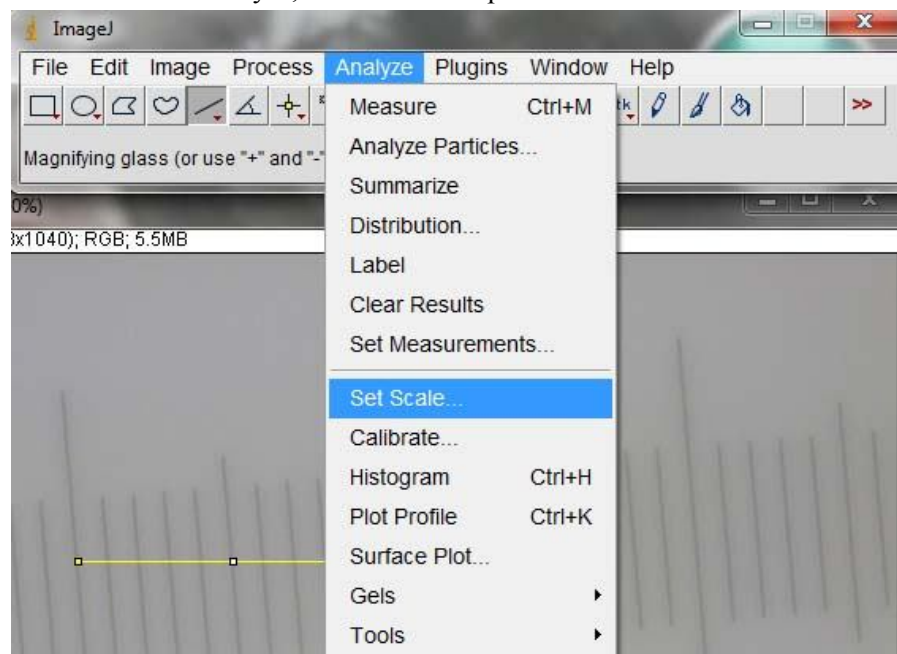
2.1. Ouvrir l'image JpeG de la lame de calibration au grossissement 40x (comme les autres images)

2.2. Sélectionner l'icône «line» dans le menu, puis « Straight Line »

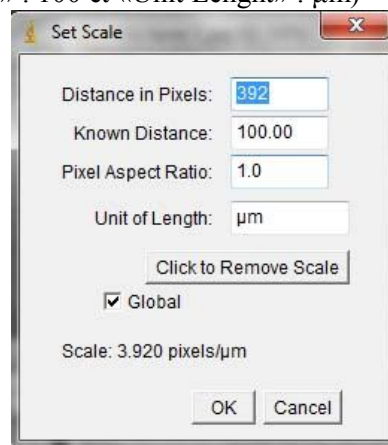


2.3. Effectuer une ligne droite d'une longueur connue sur l'échelle de la lame de calibration

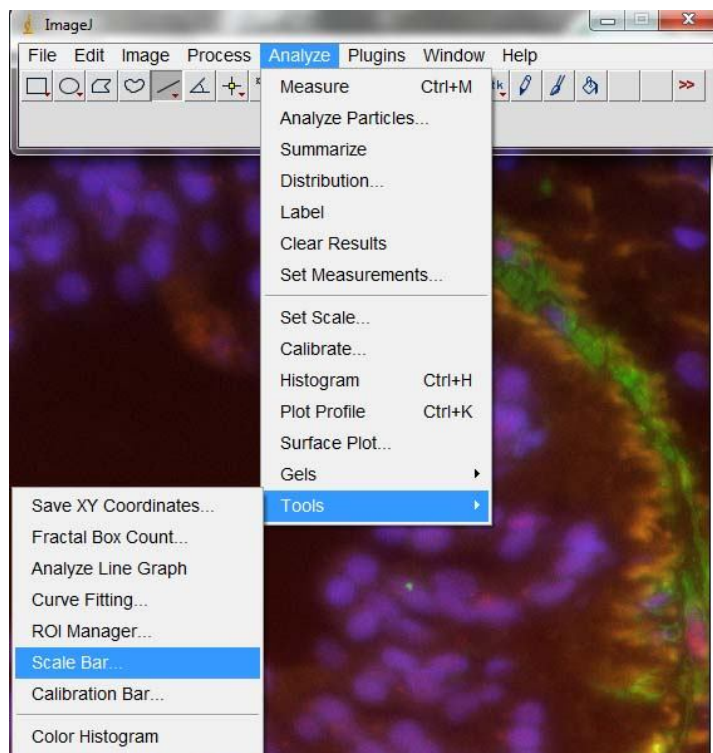
2.4. Dans le menu analyse, sélectionner l'option «set scale»



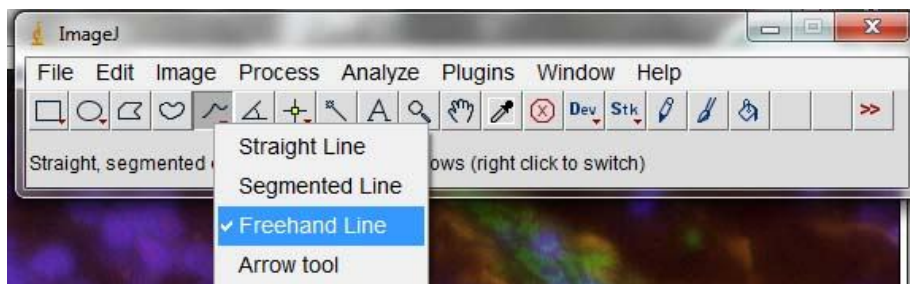
2.5. Entrer les bonnes équivalences de l'échelle pour la lame de calibration («Known Distance» : 100 et «Unit Length» :  $\mu\text{m}$ )



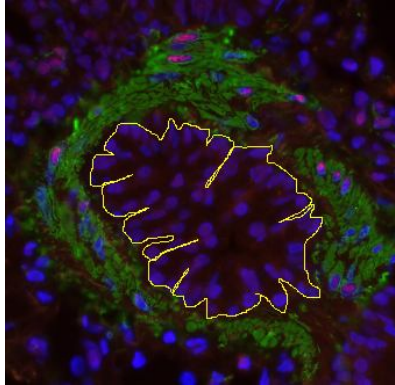
- 2.6. Cocher la case «global»
- 2.7. Cliquer sur «ok»
- 2.8. Sélectionner l'image ouverte
- 2.9. Aller dans le menu «analyse», cliquer sur «Tools», puis «Scale bar». Une échelle va apparaître sur l'image. Vérifier si les mesures sont les bonnes et décider la localisation de l'échelle dans la fenêtre qui apparaîtra.



- 2.10. Cliquer avec le bouton de droite sur l'icône «Line» et sélectionner «Freehand line».



- 2.11. Avec cet outil, suivre la base de l'épithélium (noyaux en bleu) vis-à-vis le muscle lisse en vert. (plus facile avec le Bamboo Pad®)



- 2.12. Ensuite, dans le menu «analyse» cliquer sur «mesure» (ou faire ctrl + M).
- 2.13. Dans le tableau qui apparaît, des mesures sont indiquées. «Length» est pour le périmètre de la sélection.

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	54.730	48.238	16.866	93.970	183.310
2	79.394	42.347	16.895	83.655	259.352
3	113.690	61.254	28.210	115.328	373.036
4	114.536	60.292	25.619	119.607	368.571

- 2.14. On peut aussi obtenir le périmètre en sélectionnant «set measurement» dans le menu «analyze». Dans le tableau qui apparaît, on sélectionne les mesures désirées.

<input checked="" type="checkbox"/> Area	<input checked="" type="checkbox"/> Mean Gray Value
<input type="checkbox"/> Standard Deviation	<input type="checkbox"/> Modal Gray Value
<input checked="" type="checkbox"/> Min & Max Gray Value	<input type="checkbox"/> Centroid
<input type="checkbox"/> Center of Mass	<input type="checkbox"/> Perimeter
<input type="checkbox"/> Bounding Rectangle	<input type="checkbox"/> Fit Ellipse
<input type="checkbox"/> Shape Descriptors	<input type="checkbox"/> Feret's Diameter
<input type="checkbox"/> Integrated Density	<input type="checkbox"/> Median
<input type="checkbox"/> Skewness	<input type="checkbox"/> Kurtosis
<input type="checkbox"/> Area Fraction	<input type="checkbox"/> Stack Position
<input type="checkbox"/> Limit to Threshold	<input type="checkbox"/> Display Label
<input type="checkbox"/> Invert Y Coordinates	<input type="checkbox"/> Scientific Notation
Redirect To:	None
Decimal Places (0-9):	3
<input type="button" value="OK"/> <input type="button" value="Cancel"/>	