

Université de Montréal

**CONTRIBUTION DES ISOFORMES DE LA
MYOSINE À L'OBSTRUCTION RESPIRATOIRE
DANS LE SOUFFLE CHEZ LE CHEVAL**

par ROXANE BOIVIN

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

© Roxane Boivin, 2013

Ce mémoire intitulé :

CONTRIBUTION DES ISOFORMES DE LA MYOSINE À
L'OBSTRUCTION RESPIRATOIRE DANS LE SOUFFLE
CHEZ LE CHEVAL

Présenté par :

Roxane BOIVIN, BSc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean Sirois, président-rapporteur

Jean-Pierre Lavoie, directeur de recherche

Daniel Jean, membre du jury

Résumé

La myosine est une protéine motrice impliquée dans la contraction du muscle lisse. Un de ces isoformes, appelé (+)insert lui procure une vélocité accrue. L'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution de cet isoforme au bronchospasme observé chez les chevaux atteints de souffle, un modèle d'asthme humain.

Nous avons procédé à l'analyse de l'expression génique de l'isoforme (+)insert dans les voies respiratoires de chevaux issus de 3 cohortes afin d'évaluer 1) la présence de cet isoforme chez les chevaux atteints de souffle ; 2) la réversibilité de son expression avec 2 traitements usuels (corticostéroïdes inhalés et retrait antigénique); et 3) la cinétique de réapparition de l'isoforme suite à une période de rémission de la maladie.

Les résultats révèlent 1) une expression augmentée de l'isoforme (+)insert dans l'ensemble de l'arbre bronchique des chevaux atteints de souffle en exacerbation comparée aux contrôles et aux chevaux en rémission ; 2) les deux traitements conduisent à une réduction de l'expression de l'isoforme, mais l'administration de corticostéroïdes mène à une diminution plus rapide que celle induite par le retrait antigénique; et 3) une période de 30 jours ou plus d'exposition antigénique est nécessaire pour la réapparition de l'isoforme (+)insert dans l'arbre bronchique des chevaux atteints de souffle.

Cette étude montre pour la première fois une modulation et une réversibilité de l'expression de l'isoforme (+)insert de la myosine en fonction du statut médical du sujet. Les données suggèrent que cet isoforme pourrait faire partie d'un mécanisme protecteur activé en réponse à une exposition antigénique prolongée.

Mots-clés : Myosine, muscle lisse, souffle, cheval, bronchospasme, asthme

Abstract

Myosin is a motor protein implicated in smooth muscle contraction. The (+)insert isoform doubles smooth muscle velocity. The aim of the study was to evaluate the contribution of the fast contracting myosin isoform to bronchospasm in heaves-affected horses as model of human asthma.

Gene expression analysis of the (+)insert myosin isoform in equine airways was performed in three different cohorts to evaluate 1) its presence and anatomical location in heaves-affected horses; 2) the reversibility of its expression with two common therapies (inhaled corticosteroids and antigen avoidance); and 3) its kinetics of reappearance following a chronic antigen exposure.

Results showed 1) a significantly increased expression of the (+)insert isoform at all levels of the bronchial tree of horses with heaves in clinical exacerbation when compared to control horses and heaves-affected horses in clinical remission; 2) both treatments reduced the fast isoform expression in horses' lower airways, but the administration of corticosteroids led to a faster response; and 3) (+)insert isoform does not increase in airways of all horses with heaves within 30 days of antigen exposure.

The study shows for the first time a modulation of the fast contracting myosin isoform with the disease status. Data also suggest that (+)insert isoform is part of a protective mechanism enhanced in response to a prolonged antigen exposure.

Keywords : Myosin heavy chain, smooth muscle, heaves, horse, bronchospasm, asthma

Table des matières

| | |
|--|------------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | iv |
| Table des matières..... | v |
| Liste des tableaux..... | viii |
| Liste des figures..... | ix |
| Liste des symboles & abréviations..... | xiii |
| Remerciements..... | xvi |
| Introduction..... | 1 |
| 1. Chapitre 1 : Recension de la littérature | 3 |
| 1.1. Le souffle chez le cheval..... | 3 |
| 1.1.1. Définition..... | 3 |
| 1.1.2. Facteurs de risques | 3 |
| 1.1.3. Comparaison avec l’asthme chez l’humain..... | 5 |
| 1.1.4. Modèle équin..... | 6 |
| 1.2. Le muscle lisse..... | 7 |
| 1.2.1. Caractéristiques | 7 |
| 1.2.2. Les composantes du muscle lisse | 8 |
| 1.2.3. Force et vitesse | 10 |
| 1.2.4. Contractilité | 11 |
| 1.2.5. Facteurs influençant le phénotype contractile | 11 |
| 1.2.6. Activation des composantes contractiles..... | 11 |
| 1.2.7. Cycle de contraction du muscle lisse | 12 |
| 1.3. Les isoformes de la myosine | 14 |
| 1.3.1. Caractéristiques | 14 |
| 1.3.2. Fonction biologique des différents isoformes | 15 |
| 1.3.3. Expression des différents isoformes..... | 16 |
| 1.3.4. Altération et réversibilité de l’expression des isoformes | 18 |
| 1.3.5. Implication dans le phénotype asthmatique | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Chapitre 2 : Article..... | 21 |
| 2.1. Abstract | 23 |
| 2.2. Introduction | 24 |
| 2.3. Materials and methods..... | 26 |
| 2.3.1. Experimental design and animals..... | 26 |
| 2.3.2. Pulmonary function | 26 |
| 2.3.3. Bronchoalveolar lavages | 28 |
| 2.3.4. Treatments | 28 |
| 2.3.5. Tissues | 29 |
| 2.3.6. mRNA extraction | 29 |
| 2.3.7. Reverse transcription | 30 |
| 2.3.8. Quantitative real-time PCR | 30 |
| 2.3.9. (+) and (-)insert relative quantitative protein analysis | 31 |
| 2.3.10. Statistical analysis | 33 |
| 2.4. Results..... | 35 |
| 2.4.1. Animals | 35 |
| 2.4.2. Pulmonary function & bronchoalveolar lavage cytology..... | 35 |
| 2.4.3. Quantitative real-time PCR | 36 |
| 2.5. Discussion | 44 |
| 2.6. Conclusion | 49 |
| 2.7. Acknowledgments..... | 49 |
| 2.8. References | 50 |
| 3. Chapitre 3 : Discussion générale..... | 53 |
| 3.1. Régulation | 53 |
| 3.2. Normalisation des résultats | 54 |
| 3.2.1. Gènes de référence | 54 |
| 3.2.2. Myosine et α -actine | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Résultats complémentaires | 56 |
| 3.3.1. Données brutes et autres ratios possibles | 56 |
| 3.3.2. TGF- β 1 | 65 |
| 3.4. Analyse protéique | 68 |
| | |
| 4. Chapitre 4 : Conclusion & perspectives | 70 |
| | |
| Bibliographie..... | 72 |
| ANNEXE A..... | xviii |
| ANNEXE B..... | xxii |

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I

Description of the animals, airway function and lung inflammation..... 27

ANNEXE B

Tableau II

Amorces et conditions PCR pour les gènes équins de l' α -actine et de TGF- β 1..... xxii

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1

Composantes du filament d'actine du muscle lisse..... 8

Figure 1.2

Homodimère de la myosine du muscle lisse..... 10

Figure 1.3

Cycle d'activation des composantes contractiles du muscle lisse..... 12

Figure 1.4

Cycle de contraction du muscle lisse.....13

Figure 1.5

Épissage alternatif du gène de la myosine chez l'homme..... 15

Figure 1.6

Patron d'expression des isoformes de la myosine dans les organes humains..... 17

Figure 1.7

Patron d'expression de l'isoforme (-)insert (SMA) dans un modèle d'obstruction de la vessie chez le lapin..... 19

Chapitre 2

Figure 2.1

Physiological data of horses in study 1..... 36

Figure 2.2

mRNA expression of myosin (+)insert isoform in horses' airways reported on (-)insert isoform expression..... 38

Figure 2.3

Protein expression of myosin (+)insert isoform in horses' bronchial smooth muscle 39

Figure 2.4

mRNA expression of myosin (+)insert isoform in horses' airways reported on total SMMHC..... 40

Figure 2.5

Reversibility of myosin (+)insert isoform expression in horses' endobronchial biopsies..... 42

Figure 2.6

Kinetics of myosin (+)insert isoform expression in horses' endobronchial biopsies..... 43

Chapitre 3

Figure 3.1

Données brutes de l'étude 1..... 57

Figure 3.2

Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 1..... 58

| | |
|--|-------|
| Figure 3.3 | |
| Données brutes de l'étude 2..... | 60 |
| Figure 3.4 | |
| Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 2..... | 62 |
| Figure 3.5 | |
| Données brutes de l'étude 3..... | 63 |
| Figure 3.6 | |
| Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 3..... | 65 |
| Figure 3.7 | |
| Données brutes de l'expression de TGF- β 1 pour l'étude 1..... | 67 |
| Figure 3.8 | |
| Données brutes de l'expression de TGF- β 1 pour l'étude 2..... | 68 |
| ANNEXE A | |
| Annexe A1 | |
| Sequence comparison of homologous SMMHC (+)insert in different species..... | xviii |
| Annexe A2 | |
| Experimental design for study 2..... | xviii |
| Annexe A3 | |
| Physiological data of horses in study 2..... | xix |

Annexe A4

Physiological data of horses in study 3..... xx

Annexe A5

Expression of (+)insert myosin isoform in horses' organs..... xxi

Liste des symboles & abréviations

| | |
|------------------|---|
| AA | acide(s) aminé(s) |
| ADP | adénosine diphosphate |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| ASM | <i>airway smooth muscle</i> , muscle lisse des voies respiratoires |
| ATP | adénosine triphosphate |
| BAL | <i>bronchoalveolar lavage</i> , lavage bronchoalvéolaire |
| °C | degré Celsius |
| cDNA | <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> , acide désoxyribonucléique complémentaire |
| dNTP | désoxynucléotide triphosphate |
| EDTA | <i>ethylene diamine tetra acetate</i> , acide éthylène-diamine-tétra- acétique |
| g | accélération |
| H ₂ O | eau |
| IL4R | <i>interleukine-4 receptor</i> , récepteur de l'interleukine 4 |
| kDa | kilodalton(s) |
| kg | kilogramme(s) |
| KLCM | <i>kinase light chain myosin</i> , kinase de la chaîne légère de la myosine |
| KO | <i>knock-out</i> , mutagénèse ciblée |
| L | litre(s) |
| mM | millimole(s) par litre |
| m | mètre(s) |
| Mg ²⁺ | ion magnésium |
| mg | milligramme(s) |
| miRNA | micro ARN |
| mL | millilitre(s) |

| | |
|------------------|--|
| mm | millimètre(s) |
| MYH11 | <i>myosin heavy polypeptide 11</i> , polypeptide lourd 11 de la myosine |
| nm | nanomètre(s) |
| pb | paire de bases |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , amplification en chaîne par polymérase |
| PKA | protéine kinase A |
| PKC | protéine kinase C |
| R _L | <i>pulmonary resistance</i> , résistance pulmonaire |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , acide ribonucléique |
| SEM | <i>standard error mean</i> , erreur moyenne standard |
| SD | <i>standard deviation</i> , déviation standard |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dodécyl sulfate de sodium |
| sec | seconde(s) |
| SM1 | <i>smooth muscle isoform 1</i> , isoforme 1 du muscle lisse |
| SM2 | <i>smooth muscle isoform 2</i> , isoforme 2 du muscle lisse |
| SMA | <i>smooth muscle isoform A</i> , isoforme A du muscle lisse |
| SMB | <i>smooth muscle isoform B</i> , isoforme B du muscle lisse |
| SMMHC | <i>smooth muscle myosin heavy chain</i> , chaîne lourde la myosine du muscle lisse |
| SRF | <i>serum response factor</i> , facteur de réponse au sérum |
| Th ₂ | <i>T helper 2</i> , lymphocyte auxiliaire de type 2 |
| U | unité(s) |
| µg | microgramme(s) |
| µL | microlitre(s) |
| V | volt(s) |
| V _{max} | <i>maximal velocity</i> , vitesse maximale |
| Δd | déplacement |

*« L'amour et la musique sont les
deux ailes de l'âme. »*

(Berlioz)

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier Dr Jean-Pierre Lavoie, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné la chance de faire partie de son équipe et pour avoir eu confiance en moi tout au long de ce projet. Merci pour votre soutien, votre rigueur et vos encouragements. Merci de votre disponibilité, même lorsque vous êtes absent, de votre écoute et votre ouverture d'esprit. Vous avez un don pour nous transmettre votre curiosité scientifique et votre amour de la recherche sans que l'on s'en rende compte. Merci de m'avoir offert une formation solide qui me permettra d'entamer une carrière avec confiance. Sincères remerciements.

Merci aux assistantes de recherche passées et présentes, Josiane Lefebvre-Lavoie et Amandine Vargas. Josiane pour ta rigueur scientifique, ton incroyable sens de l'organisation et ta capacité à nous garder sur le droit chemin. Amandine pour ta gentillesse, ton dévouement, ta disponibilité et ton amour inconditionnel pour la recherche. Vous avez été toutes deux de belles sources d'inspiration et des partenaires de travail inoubliables. Sincères remerciements.

À tous les autres membres du laboratoire, Michela, Mylène, Aude, Émilie, Mireille, Mathilde, Anouk, Véronique, Gaëlle, Alexandra, Catherina, Marion, Yoana et Pamela, pour avoir contribué à former une équipe multidisciplinaire formidable. Grâce à vous ces deux années ont été aussi enrichissantes professionnellement que personnellement. Vos présences ont agrémenté les journées de dur labeur. Sincères remerciements.

Aux collaborateurs du projet, Dre Anne-Marie Lauzon et aux membres de son laboratoire, Nedjma Zitouni et Linda Kachmar, pour leurs judicieux conseils, leur rigueur et leur rayonnement. Sincères remerciements.

Aux organismes subventionnaires et à la Faculté de médecine vétérinaire qui soutiennent et stimulent la recherche au sein de la communauté et qui nous permettent de faire connaître nos travaux à travers les congrès et les rencontres scientifiques. Sincères remerciements.

Aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce mémoire. Vos commentaires et suggestions seront plus que bienvenus. Merci de bien vouloir participer à l'avancement de ces travaux et de mettre à contribution votre savoir et votre expérience dans la réalisation de ce projet. Sincères remerciements.

À ma famille, mes parents particulièrement, qui m'ont toujours encouragée dans mes études, même s'ils ne comprenaient pas toujours ce que je faisais. Merci de votre soutien et de votre amour, de votre générosité et de vos conseils, merci de seulement être là. J'espère que vous serez fiers de votre bébé fille! Sincères remerciements.

Merci enfin à Mathieu, mon compagnon de vie, qui me supporte et m'encourage depuis plusieurs années. Tu m'as soutenu les bons comme les mauvais jours, a entendu mes joies et écouté mes déceptions. Merci d'être resté jusqu'au bout, merci de ta patience et merci de m'aider à accrocher ce nouveau diplôme sur le mur! Je t'aime! Sincères remerciements.

Introduction

Les manifestations du souffle résultent d'une obstruction récurrente des voies respiratoires inférieures qui est accompagnée d'une hyperréactivité bronchique en réponse à une exposition antigénique. Cette affection dérive de la domestication de l'animal, puisque la condition est rare chez les chevaux gardés à l'extérieur. On retrouve une description de cette condition aussi loin que dans l'antiquité, alors qu'on remarque que les chevaux manifestent des signes cliniques tels qu'une respiration sifflante et une intolérance persistante à l'effort suite à la stabulation. Les similarités de cette maladie avec l'asthme chez l'humain font du cheval atteint de souffle un bon modèle d'étude.

Le bronchospasme est l'élément central de la maladie, mais les mécanismes qui régissent l'obstruction qui en découle restent encore mal définis. La contraction des muscles lisses entourant les voies respiratoires provoque la réduction de la lumière de celles-ci, offrant plus de résistance au passage de l'air. La contraction du muscle est possible grâce à l'interaction de deux protéines; l'actine et la myosine. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la myosine, une protéine motrice dont il existe plusieurs isoformes, tous produits par l'épissage alternatif d'un seul gène.

À travers d'autres études, on remarque que l'isoforme dit « rapide » (ou (+)insert) possède un insert de 7 AA dans le domaine moteur, ce qui procure au muscle lisse une vitesse accrue. L'expression de cet isoforme est plus importante dans des tissus composés de muscle lisse phasique, à contraction plus importante, tels que l'estomac et l'intestin. Dans un contexte exempt de pathologie, cet isoforme est peu exprimé dans l'arbre respiratoire. Par contre, une étude récente a démontré qu'il était surexprimé dans les biopsies endobronchiques de patients asthmatiques humains. Malgré les informations contenues dans la littérature scientifique, il reste difficile d'associer l'isoforme « rapide » de la myosine au phénotype asthmatique, puisque sa localisation anatomique dans les voies respiratoires est mal définie et que la démonstration de la réversibilité de son expression n'a été démontrée qu'au niveau de la vessie. Le projet se veut donc innovateur, puisqu'il sera le premier à

étudier la modulation de l'expression et la cinétique de l'isoforme « rapide » de la myosine dans un modèle équin d'asthme. Nous avons ainsi évalué l'expression génique et protéique de cet isoforme dans les voies respiratoires de chevaux atteints de souffle exposés à des allergènes, à la suite d'un retrait antigénique et en fonction de deux différents traitements, ainsi que la cinétique de réapparition de cet isoforme lors d'une exposition aux allergènes faisant suite à une période de rémission clinique.

1. Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1. Le souffle chez le cheval

1.1.1. Définition

Les signes cliniques du souffle résultent d'une obstruction variable et récurrente des voies respiratoires inférieures accompagnée d'une réactivité bronchique (Robinson, 2001). Il est caractérisé par des épisodes de toux et une respiration sifflante. C'est une condition pathologique qui se développe chez le cheval et perdure pendant plusieurs années, avec des événements de bronchoconstriction et d'inflammation, ce qui en fait la maladie qui s'apparente le plus à l'asthme chez l'humain (Leclere et al., 2011b). Au repos, les animaux démontrent de la difficulté à respirer lorsqu'ils sont en exacerbation clinique et ils développent une intolérance à l'effort qui persiste entre les crises.

1.1.2. Facteurs de risques

a) Environnement

Le souffle est une maladie découlant de la domestication du cheval. L'environnement semble être un facteur déterminant du développement de la pathologie. Lors de la stabulation, le cheval est exposé à de nombreux allergènes tels que les particules végétales, les moisissures, les acariens et les spores fongiques, qui peuvent déclencher les signes cliniques (Jean et al., 1999).

b) Alimentation

Le foin et la paille peuvent contenir plusieurs allergènes, surtout s'ils sont mal préparés ou mal entreposés. L'inhalation des poussières et particules qui en émanent lors de l'ingestion de ces aliments peuvent contribuer au développement de la maladie (Woods et al., 1993). On observe d'ailleurs que le retrait du foin de la diète

peut suffire à diminuer les symptômes cliniques des chevaux atteints de souffle (Jackson et al., 2000).

c) Géographie

Le souffle est une affection qui se produit chez 10 à 20% des chevaux adultes de l'hémisphère nord et d'autres climats tempérés (Hotchkiss et al., 2007). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le climat de ces régions entraîne une mise à l'écurie pour des périodes prolongées, durant lesquelles la diète principale des animaux se compose de fourrages transformés. La maladie est plus rare dans les régions où la clémence des saisons permet aux chevaux d'être à l'extérieur toute l'année.

d) Saison

Le souffle est une affection saisonnière plus fréquemment observée durant les saisons froides, alors que les chevaux sont gardés à l'écurie.

e) Âge

La maladie a une prévalence plus élevée chez les chevaux d'âge adulte et il a été constaté que les infections respiratoires avant l'âge de 5 ans, de même que l'exposition au foin en bas âge, sont des facteurs de risque au développement du souffle (Hotchkiss et al., 2007).

f) Génétique

Le souffle est une maladie complexe, dont le phénotype est le résultat de l'interaction du génotype et de l'environnement. Il devient alors difficile de mettre en cause des gènes spécifiques. Toutefois, une analyse de liaison et un scan du génome équin tendent à conclure qu'une région du chromosome 13 (Jost et al., 2007), contenant le gène IL4R et une région du chromosome 15 (Swinburne et al., 2009) seraient associées à l'obstruction des voies respiratoires. Une étude a aussi montré que l'incidence de la maladie était plus élevée chez une progéniture dont un ou les deux parents étaient atteints de souffle (Marti et al., 1991). Il y a donc

vraisemblablement une composante génétique au souffle dont le rôle exact est inconnu, mais elle reste difficile à démontrer de par la complexité de la maladie.

1.1.3. Comparaison avec l'asthme chez l'humain

La pathogénèse de la maladie inclut un remodelage des parois des voies respiratoires, tel qu'observé chez l'humain asthmatique. On note entre autre la présence d'altérations structurales telles que l'épaississement des parois bronchiques, la fibrose, l'augmentation de la production de mucus ainsi que l'hypertrophie et l'hyperplasie des myocytes (Leclere et al., 2011b; Monteseirin, 2009). Tel qu'observé dans l'asthme, les symptômes du souffle sont variables en intensité et diffèrent d'un individu à l'autre. Ils sont également changeant en fonction des jours, des saisons et de l'environnement. De plus, les signes cliniques et l'obstruction respiratoire peuvent être renversés par l'administration de bronchodilatateurs, de corticostéroïdes ou en modifiant le milieu dans lequel se trouvent les chevaux, avec une mise au pâturage par exemple (Jackson et al., 2000; Leclere et al., 2011b). On observe aussi que la prédominance de l'inflammation intraluminal est de nature neutrophilique dans le souffle, tel qu'observé chez certains patients asthmatiques (Jean et al., 2011; Macedo et al., 2009). Dans les deux conditions (asthme et souffle), les composantes allergènes sont supportées par la présence d'un patron d'expression similaire de cytokines de type Th2 (Barnes, 2008; Lavoie et al., 2001). L'asthme et le souffle sont également comparables de par la présence d'un polymorphisme du gène IL4R chez certains sujets (Isidoro-Garcia et al., 2005; Jost et al., 2007; Pinto et al., 2008). Finalement, les voies respiratoires des chevaux atteints de souffle répondent aux β -agonistes, tout comme chez l'humain asthmatique (Bel et al., 1991; Derksen et al., 1996; Tesarowski et al., 1994).

1.1.4. Modèle équin

a) Avantages

Chez les animaux domestiques, le cheval est l'un des seuls, avec le chat, à être affecté d'une condition pathologique naturelle qui s'apparente à l'asthme (Leclere et al., 2011b). Le modèle équin est très utile pour l'étude de cette maladie, puisqu'il offre de nombreux avantages aux chercheurs. Avec une durée de vie variant entre 30 et 35 ans, le cheval offre une possibilité d'étude sur une échelle de temps plus large que chez les rongeurs ou le chat par exemple. Également, le cheval développe des signes cliniques persistants, contrairement aux autres modèles de rongeurs, cochons, chiens ou ruminants chez lesquels la crise asthmatique est induite par l'administration d'allergènes exogènes. Le cheval présente des exacerbations naturelles, alors que chez le chat, elles sont rares et doivent être induites, tout comme chez les autres modèles animaux. De par son tempérament calme et malléable, la sédation du cheval debout est suffisante à la collecte de données (biopsies, lavages bronchoalvéolaire). Le modèle équin est aussi utile dans l'étude du remodelage des voies respiratoires, étant donné qu'il s'agit d'une réponse immune complexe se développant sur plusieurs années. De même, ce modèle animal permet la réalisation d'études sur les mécanismes et l'évolution du remodelage des voies respiratoires, et ce, à plusieurs stades de la maladie, et sur des animaux symptomatiques et asymptomatiques, ce qui reste ardu à exécuter chez l'homme (Leclere et al., 2011b). Le modèle équin est d'autant plus représentatif de l'asthme humain, puisque le développement des poumons chez l'homme et le cheval est très similaire. En effet, les deux espèces possèdent une circulation bronchiale bien développée, une plèvre épaisse et présentent des bronchioles terminaux (Leclere et al., 2011b). Également, le cheval possède un bon développement des muscles lisses depuis la trachée jusqu'aux alvéoles.

b) Inconvénients

Le modèle équin comporte certaines limitations. Il reste difficile, de par l'hétérogénéité génétique des animaux affectés et par le caractère naturel de la

maladie, d'atteindre une bonne puissance statistique pour l'étude de petits effets. Également, les extrapolations à l'homme peuvent être erronées en raison de la disparité du métabolisme des nutriments et des médicaments ainsi que des différences inter-espèces existantes au niveau de l'expression de certains récepteurs et médiateurs immunitaires. Il est aussi difficile d'obtenir une population de grande taille et on doit souvent se contenter d'un échantillonnage ne dépassant souvent pas 10 à 15 individus. Les outils moléculaires tels que des anticorps spécifiques à l'espèce sont parfois manquant et retardent les avancées. Finalement, les coûts onéreux des équipements et les installations particulières qui sont nécessaires à la recherche avec le modèle équin sont aussi d'importants éléments limitants (Bice et al., 2000; Leclere et al., 2011b).

1.2. Le muscle lisse

1.2.1. Caractéristiques

Le muscle lisse est un tissu contractile qui se situe principalement dans les parois des systèmes digestif, urinaire, respiratoire et dans les parois vasculaires. Son rôle principal est d'aider au transport des substances à travers l'organisme (nourriture, déchets, etc.). Dans le système respiratoire, il contrôle le diamètre des voies et la résistance au passage de l'air (Gerthoffer, 1991). Les muscles lisses sont sous le contrôle du système nerveux autonome ; leurs mouvements ne peuvent donc pas être engendrés de manière volontaire. Les cellules musculaires lisses possèdent des composantes contractiles très semblables à celle retrouvées dans les cellules des muscles striés (Rosenfeld et al., 1998), dont l'actine et la myosine. La principale différence se situe dans l'organisation des filaments contractiles. Dans la cellule du muscle lisse, les filaments d'actine (filaments minces) sont perpendiculaires les uns aux autres, formant une sorte de quadrillage dans lequel l'actine est liée à des corps denses qui servent de points d'ancrage. Les filaments de myosine (filaments épais) quant à eux se positionnent entre les filaments d'actine, établissant un pont entre deux filaments. Alors qu'au repos elle est fusiforme et allongée, la cellule musculaire lisse

prend une forme globulaire lors de la contraction. Cette contraction, plus lente et soutenue que celle du muscle squelettique, est possible grâce à l'action complémentaire qu'exerce l'actine, la myosine et leurs protéines régulatrices.

1.2.2. Les composantes du muscle lisse

a) L'actine

Chez les vertébrés, il existe 6 isoformes de l'actine, tous générés par des gènes différents (Morgan and Gangopadhyay, 2001; North et al., 1994). Les variantes sont notés ainsi : α -squelettique, α -cardiaque, α -vasculaire, β -cytoplasmique, γ -entérique et γ -cytoplasmique. Les isoformes α -vasculaire et γ -entérique sont les plus souvent associés à l'actine du muscle lisse et possèdent des propriétés contractiles (Morgan and Gangopadhyay, 2001) tandis que l'isoforme β -cytoplasmique se concentre dans les corps denses (North et al., 1994). La séquence d'acides aminés des différents isoformes est très bien conservée à travers les espèces, ce qui témoigne de l'importance biologique de l'actine. De manière générale, l'actine est composée d'une molécule monomérique nommée actine G (glomérulaire). Celle-ci a la capacité de se polymériser et de former un microfilament, qui est alors appelé actine F (filamenteuse). Deux filaments s'assemblent ensuite, ce qui résulte en une structure en double hélice qui forme le filament mince, d'un diamètre moyen de 6 à 8 nm (Figure 1.1) (Morgan and Gangopadhyay, 2001). L'actine du muscle lisse est liée à différentes protéines dont les fonctions restent sont encore débattues.

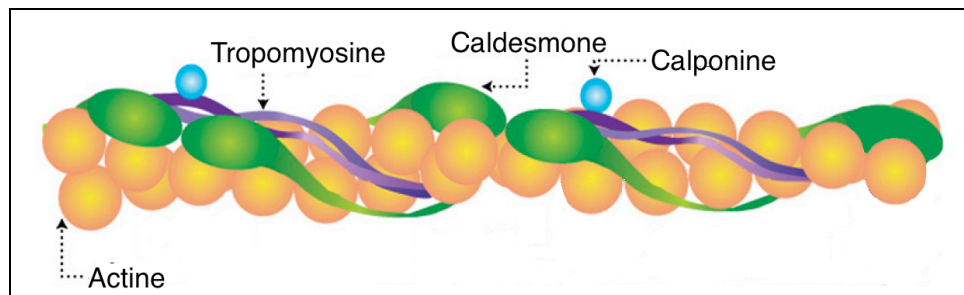


Figure 1.1. Composantes du filament d'actine du muscle lisse.

Adapté de Hamid et al., 2005.

b) La tropomyosine

La tropomyosine est une protéine de forme allongée de 66 kDa enroulée en hélice α qui se loge dans les sillons du filament mince d'actine (Adelstein and Eisenberg, 1980). Chaque unité de tropomyosine couvre une moyenne de 7 monomères d'actine (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Grâce à une interaction tête-à-queue, les protéines de tropomyosine forment un filament continu le long de la fibre d'actine. La fonction de la tropomyosine reste incertaine dans le muscle lisse, mais on croit qu'elle permettrait la transmission simultanée d'informations à plusieurs sites où interagissent l'actine et la myosine, de manière à produire une action coordonnée. Dans le muscle cardiaque et squelettique, la tropomyosine interagirait avec la troponine et l'actine afin de réguler les interactions actine-myosine (Adelstein and Eisenberg, 1980).

c) La caldesmone

La caldesmone est une protéine possédant des sites de liaison à l'actine, à la myosine, à la tropomyosine et à la calmoduline. Les études tendent à démontrer que la caldesmone jouerait un rôle endogène de supprimeur du tonus contractile du muscle lisse, en inhibant les interactions actine-myosine (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Cette action inhibitrice pourrait être levée par la présence du complexe calcium-calmoduline qui, en se liant à la caldesmone, lui imposerait un changement de conformation et diminuerait de manière locale son affinité pour l'actine.

d) La calponine

La calponine est une protéine régulatrice de l'actine dont il existe trois isoformes. Elle contient un domaine de liaison à l'actine, homologue à la troponine I (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Son rôle reste encore controversé, mais elle pourrait agir comme un inhibiteur de l'activité Mg-ATPase de la myosine (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Une autre hypothèse suggère que la calponine serait une protéine adaptatrice qui faciliterait l'activation de la protéine kinase C (PKC) en la fixant à la surface de la membrane cellulaire.

e) La myosine

La myosine est une protéine faisant partie de la superfamille des protéines motrices. Il s'agit d'un hexamère composé de 6 sous-unités, soit 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères (White et al., 1993) dont 2 régulatrices et 2 essentielles (Low and White, 1998) (Figure 1.2). Les chaînes lourdes de la myosine contiennent les domaines moteurs (aussi appelés têtes de myosine) situés à l'extrémité N-terminal de la molécule. Elle a la capacité de se lier à l'actine et à l'ATP. Elle utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour générer une force et un mouvement le long du filament d'actine. Elle est surtout impliquée dans la contraction des muscles squelettiques et lisses. Ces domaines permettent le mouvement proprement dit du muscle et possèdent un site de liaison à l'actine et une poche où l'ATP peut se loger. Les régions de queue, en C-terminal, ont la capacité de s'assembler pour former un filament épais de 15 à 18 nm (Morgan and Gangopadhyay, 2001) duquel émergent les têtes, permettant ainsi la liaison au filament mince (Leguillette and Lauzon, 2006).

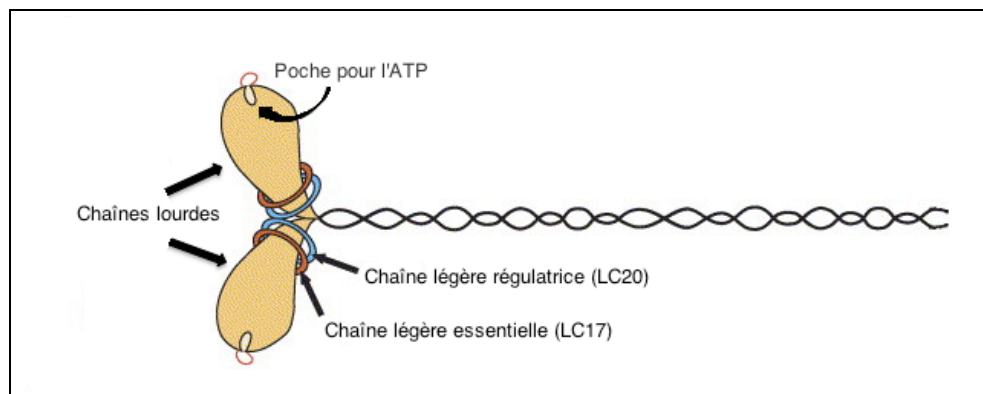


Figure 1.2. Homodimère de la myosine du muscle lisse.

Adapté de Leguillette and Lauzon, 2006.

1.2.3. Force et vitesse

La force et la vitesse sont le reflet des propriétés dynamiques du cycle de contraction du muscle. La force est générée par le muscle en fonction du nombre de

liaisons entre le filament d'actine et de myosine. Ainsi, plus il y a de liens, plus la force générée sera grande. La vitesse quant à elle se définit comme étant la vitesse d'exécution de la contraction (Gunst and Tang, 2000).

1.2.4. Contractilité

La contractilité du muscle lisse est caractérisée par 3 facteurs. D'abord par la force isométrique active optimale, qui est la force maximale produite par unité de surface du muscle lors d'une contraction à longueur constante. Puis la longueur optimale, c'est-à-dire la longueur à laquelle le muscle atteint sa force maximale. Enfin, la capacité de rétractation du muscle ou sa propension à raccourcir (Gunst and Tang, 2000).

1.2.5. Facteurs influençant le phénotype contractile

Il existe différents facteurs qui peuvent influencer la contractilité du muscle, notamment une augmentation de la masse du muscle, une diminution de la charge statique contre laquelle le muscle raccourcit, et une diminution de la charge fluctuante qui perturbe la liaison de la myosine durant la contraction (Chung, 2008).

1.2.6. Activation des composantes contractiles

L'activation de la myosine par la phosphorylation de sa chaîne légère régulatrice est une étape essentielle pour qu'il puisse y avoir une contraction. À l'arrivée d'un stimulus, il se produit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Les molécules de calcium se lient avec une molécule de calmoduline à raison de 4:1. La calmoduline est une molécule produite de façon ubiquitaire dans l'organisme et qui participe à l'activation de plusieurs protéines. Le complexe calcium-calmoduline s'associe ensuite avec une kinase de la chaîne légère régulatrice (KLCM), préalablement activée par la protéine kinase A (Repka et al., 1986; Somlyo and Somlyo, 1994). Les kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un

groupement phosphate de l'ATP sur une autre molécule. Ici, le phosphate est transféré sur une sérine d'une chaîne légère régulatrice de la myosine, ce qui permet son activation (Figure 1.3). Suite à cette étape, la contraction du muscle lisse pourra être possible grâce à l'interaction du filament d'actine avec les têtes de myosine et de la présence d'ATP.

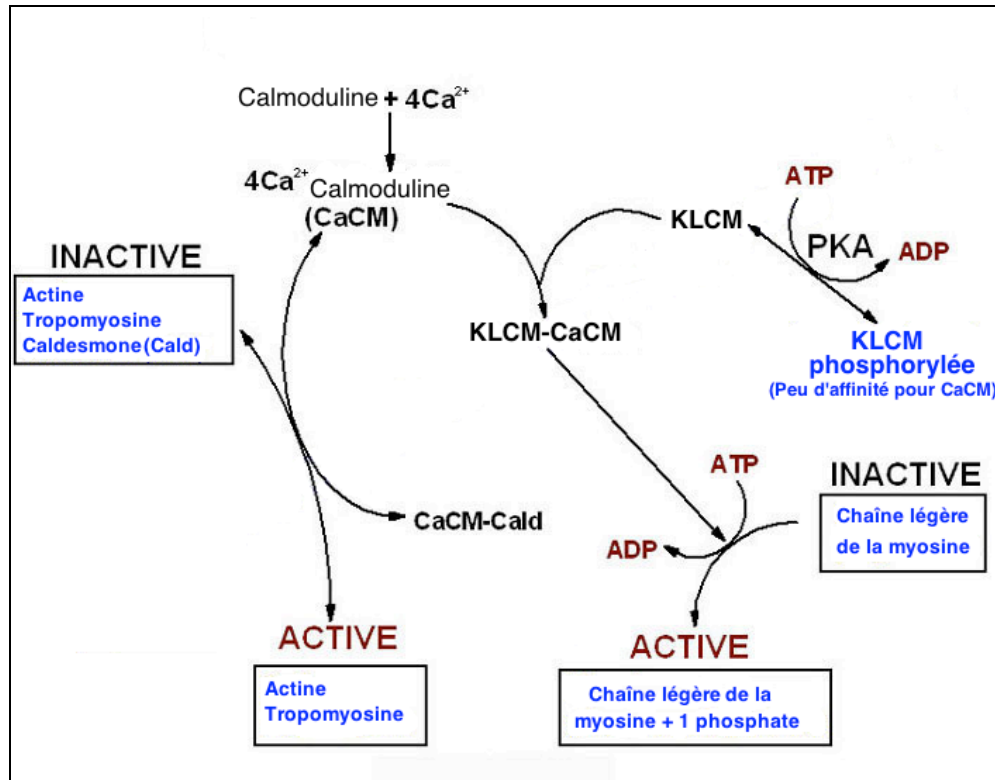


Figure 1.3. Cycle d'activation des composants contractiles du muscle lisse.

Adapté de King.

1.2.7. Cycle de contraction du muscle lisse

À l'état de repos du muscle, la tête de la myosine est liée à l'actine, à une molécule d'ADP et à une molécule de phosphate inorganique (Figure 1.4). Ayant peu d'affinité pour l'ADP et le phosphate, ces deux composantes sont relâchées. Cela engendre un pivotement de la tête de myosine, qui tire sur le filament d'actine auquel il est toujours lié. Étant ancré aux corps denses, eux-mêmes reliés à la membrane

cellulaire, les filaments d'actine contraignent alors la cellule à adopter une forme globulaire, c'est la contraction. Lorsqu'une nouvelle molécule d'ATP vient se lier à la tête de myosine, celle-ci adopte une configuration à basse énergie et elle se détache du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et en un phosphate inorganique au site ATPasique de la tête de myosine permet à celle-ci de changer de conformation. Elle se redresse et retrouve une configuration à haute énergie, ce qui lui permet à nouveau de se lier au filament d'actine, puis le cycle recommence (Rhee and Brozovich, 2000; Somlyo and Somlyo, 1994). On retrouve souvent l'appellation «crossbridge cycle» pour décrire ce processus. Plus ce cycle est rapide, plus la contraction sera rapide.

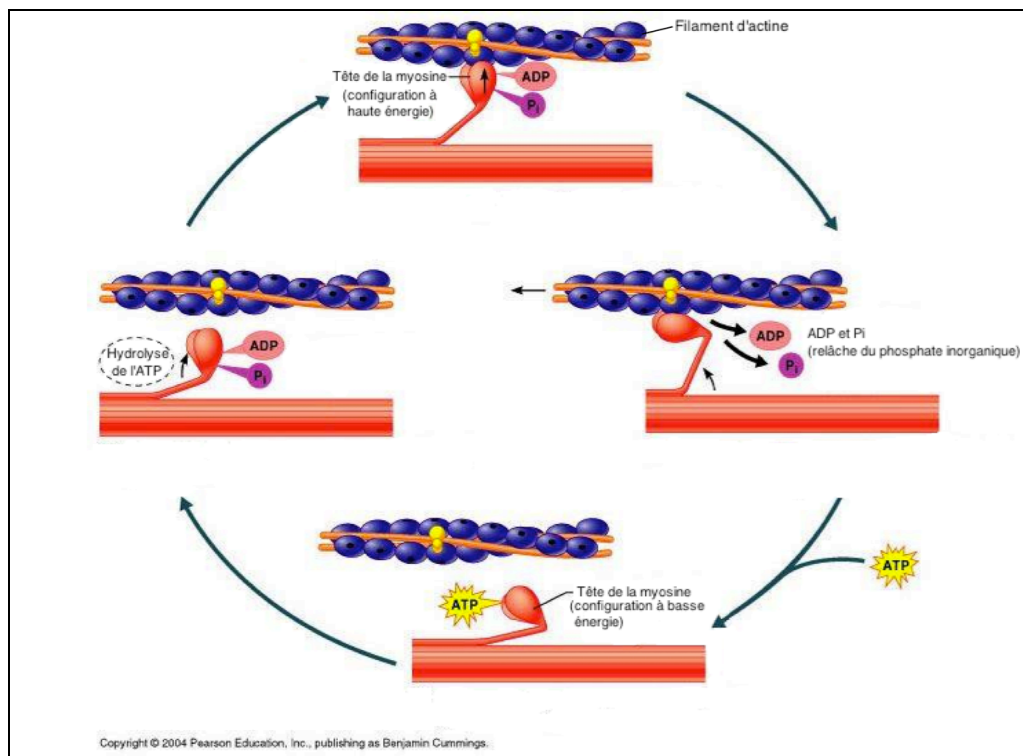


Figure 1.4. Cycle de contraction du muscle lisse. Aussi appelé « crossbridge cycle ».

Adapté de Becker et al., 2006.

1.3. Les isoformes de la myosine

1.3.1. Caractéristiques

Les chaînes lourdes de la myosine sont présentes en 4 différents isoformes, tous issus de l'épissage alternatif d'un seul et unique gène, MYH11 (Lauzon et al., 1998a; Leguillette et al., 2005; Leguillette and Lauzon, 2006). Les deux premiers isoformes, annotés SM1 et SM2 diffèrent par leur extrémité C-terminal (Figure 1.5). SM1 possède une région de queue plus longue, avec 43 acides aminés et l'exclusion de l'exon 41 lors de l'épissage fait passer la traduction de l'exon 40 à l'exon 42. L'isoforme SM2 possède une région de queue de 9 acides aminés seulement, puisque l'exon 41 présent dans cet isoforme, encode un codon STOP qui provoque l'arrêt prématuré de la traduction. Il existe 2 autres isoformes, caractérisés par des différences au niveau du domaine moteur, en N-terminal. Pour l'isoforme appelé SMA ou (-)insert, la séquence est dite sans insert et la traduction passe de l'exon 5 à l'exon 6. L'isoforme SMB ou (+)insert quant à lui, contient un insert de 7 AA, qui est en fait un exon supplémentaire de 21 paires de bases entre les exons 5 et 6 de l'ARN messager ; on le nomme l'exon 5b (Leguillette et al., 2005; White et al., 1993). Cet insert dont la séquence est QG**PS**FAY chez l'homme et QG**P**LAY chez le cheval, se situe à la surface de la boucle 1 qui relie 2 domaines de la tête de myosine, au dessus de la poche où se loge l'ATP (Gil and Lauzon, 2007; Lauzon et al., 1998b; Leguillette et al., 2005; Leguillette and Lauzon, 2006).

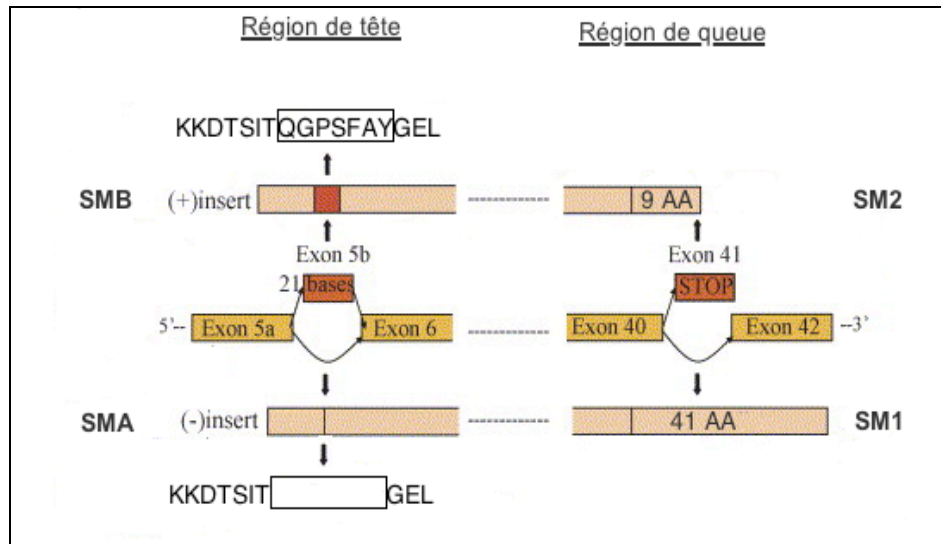


Figure 1.5. Épissage alternatif du gène de la myosine chez l'homme.

Adapté de Leguillette and Lauzon, 2006.

1.3.2. Fonction biologique des différents isoformes

La boucle 1 de la tête de myosine joue un rôle central dans le relâchement de la molécule d'ADP lors du « crossbridge cycle ». Elle effectue un mouvement caractéristique qui précède la relâche de cette molécule et qui est déterminant dans le contrôle de la vitesse de la contraction (Decarreau et al., 2011; Sweeney et al., 1998). La vitesse maximale de la contraction est séquence-dépendante et l'altération de la boucle 1 est directement reliée à la régulation du relâchement d'ADP. Il a également été observé que la taille de la boucle 1 est un facteur déterminant de la vitesse. En effet, lorsque la boucle est petite, tel que dans l'isoforme (-)insert, l'accès au site catalytique de la tête de myosine est restreint. La liaison de l'ADP est donc favorisée au détriment de la liaison de l'ATP (Sweeney et al., 1998). L'hydrolyse de l'ATP est aussi ralenti, ce qui engendre un « crossbridge cycle » plus lent. À l'opposé, lorsque la boucle 1 est grande, tel qu'avec l'isoforme (+)insert, la flexibilité de la boucle est augmentée, ce qui facilite à la fois le relargage de l'ADP et du phosphate inorganique et la liaison de l'ATP au site catalytique (Gil and Lauzon, 2007; Lauzon et al., 1998a; Leguillette et al., 2009; Rovner et al., 1997). On estime que l'insert de 21 pb

influencerait les fonctions enzymatiques et cinétiques de la myosine, étant donné sa position dans le domaine moteur. Il permettrait l'augmentation de la vitesse maximale (V_{max}) du muscle par la diminution du temps de «crossbridge cycle» (Babu et al., 2001; Leguillette et al., 2005). Il est rapporté que la présence de l'insert est nécessaire et suffisante à l'augmentation des propriétés cinétiques de la myosine (Gil and Lauzon, 2007; Lauzon et al., 1998a; Leguillette et al., 2005; Leguillette and Lauzon, 2006; Rovner et al., 1997). En comparant les extraits de myosine de plusieurs tissus de dindon et de lapin, il a été constaté que la présence de l'isoforme (+)insert est associée avec une activité ATPasique 2 fois plus élevée et un taux de propulsion du filament d'actine plus important qu'avec l'isoforme (-)insert (Gil and Lauzon, 2007; Kelley et al., 1993; Rovner et al., 1997). Babu et al. (2001) montrent également que des vaisseaux sanguins de souris KO pour l'isoforme (+)insert ont une contraction plus lente que les souris contrôles, suggérant que cet isoforme possède une activité ATPasique plus importante que l'isoforme (-)insert. Lauzon et al. (1998a) ont montré, à l'aide de la méthode du «laser trap» que la vitesse du filament d'actine est 2 fois plus élevée en présence de l'isoforme (+)insert de la chaîne lourde de la myosine. L'insert permettrait donc des interactions actine-myosine plus rapides en diminuant le temps d'un cycle de contraction. Aucune différence dans le mécanisme *in vitro* des isoformes SM1 et SM2 n'est connue. Ces isoformes semblent plutôt se distinguer par leur capacité à former les filaments épais (Gil and Lauzon, 2007).

1.3.3. Expression des différents isoformes

Les isoformes (-)insert et (+)insert de la myosine sont coexprimés dans tous les tissus contenant du muscle lisse. Toutefois, la proportion de chacun des ARNm est différente entre les tissus (Figure 1.6). Généralement, l'isoforme (-)insert est exprimé dans les organes qui contiennent du muscle lisse de type tonique, caractérisé par une contraction et une relaxation lente (Rhee and Brozovich, 2000). Ce type de muscle peut maintenir une contraction plus longtemps en utilisant peu d'énergie, puisque l'isoforme (-)insert possède une plus grande affinité pour l'ADP, ce qui

prolonge la durée du « crossbridge cycle » (Rovner et al., 1997). Les muscles lisses de type tonique sont présents dans des tissus tels que l'aorte et l'utérus. L'isoforme (+)insert quant à lui est prédominant dans les muscles lisses phasiques, dont la contraction et la relaxation sont plus rapides (Gil and Lauzon, 2007; Lauzon et al., 1998a; Rhee and Brozovich, 2000). Les échanges facilités d'ADP et d'ATP observés avec cet isoforme font en sorte que le cycle de contraction de ces muscles se produit plus rapidement que celui des muscles toniques. Les muscles lisses phasiques se retrouvent notamment dans l'estomac et le petit intestin, des organes dont la contraction est fréquente.

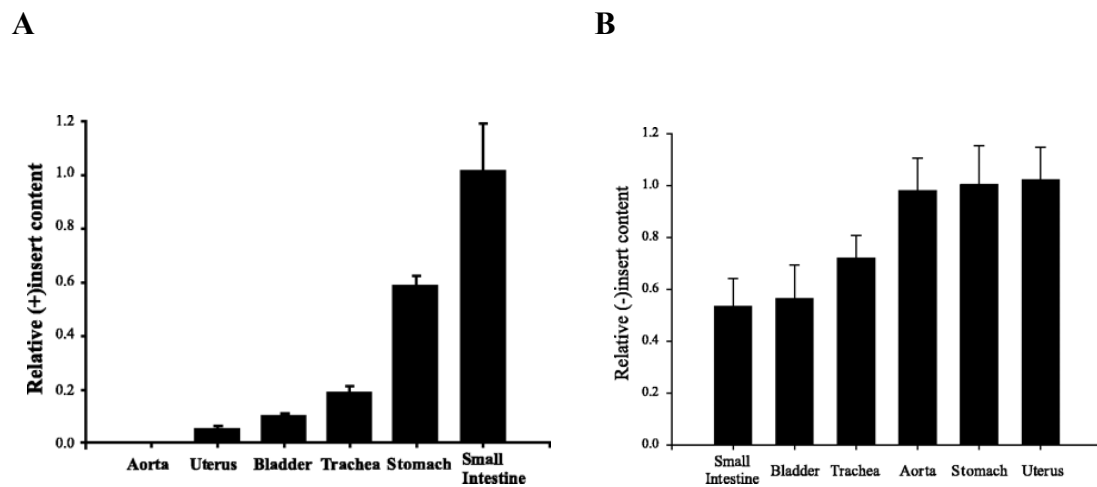


Figure 1.6. Patron d'expression des isoformes de la myosine dans les organes humains. (A) Expression de l'isoforme (+)insert; (B) Expression de l'isoforme (-)insert.

Tiré de Leguillette et al., 2005.

1.3.4. Altération et réversibilité de l'expression des isoformes

Les niveaux d'expression des deux isoformes présents dans les muscles lisses semblent sujets à fluctuer en présence de pathologie. Il s'agirait d'un phénomène réversible et dont les effets seraient observables en quelques jours, du moins au niveau de la vessie. En reproduisant les effets de l'hyperplasie bénigne de la prostate par l'obstruction de l'urètre dans un modèle de lapin, DiSanto et al. (2003), ont pu observer une augmentation significative de la proportion de l'isoforme (-)insert dans le muscle détrusor de la vessie dans les 7 jours suivant l'obstruction, alors que la vessie était dysfonctionnelle. Ce changement d'isoforme concorde avec une modification du phénotype contractile du muscle. Ordinairement de type phasique, le muscle devient à caractère tonique et voit sa vélocité maximale diminuer, de même que la force qu'il peut générer (DiSanto et al., 2003). Lorsque l'obstruction est levée, en 7 jours le muscle détrusor retrouve ses propriétés phasiques : l'expression de l'isoforme (+)insert est augmentée, celle de l'isoforme (-)insert est diminuée et la vessie reprend une fonction normale (Figure 1.7). On peut aisément penser qu'un tel phénomène est également possible dans les muscles lisses des voies respiratoires, où une augmentation de l'isoforme (+)insert provoquerait une importante bronchoconstriction, réversible par le retrait antigénique, autant dans l'asthme humain que dans le souffle chez le cheval. Les mécanismes engendrant l'expression d'un isoforme plutôt qu'un autre ne sont jusqu'à présent pas explorés. Bien que l'épissage alternatif du gène soit un phénomène connu, les facteurs et voies de signalisation régulant ce procédé sont inconnus. Il reste donc difficile de dresser un portrait clair des éléments qui influencent la production d'une protéine avec ou sans insert.

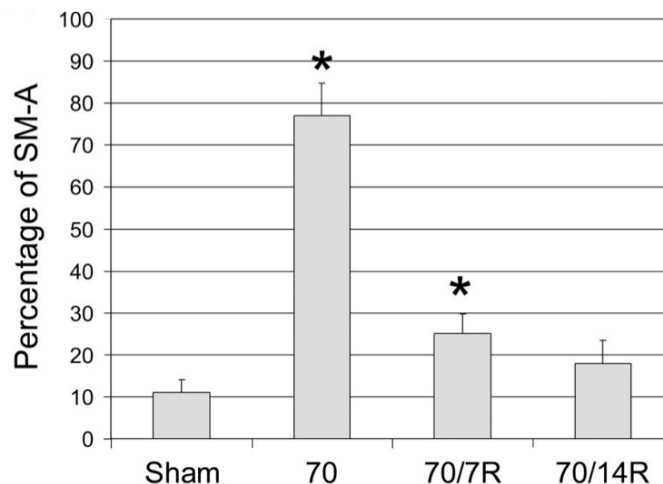


Figure 1.7. Patron d'expression de l'isoforme (-)insert (SMA) dans un modèle d'obstruction de la vessie chez le lapin. Sham : Contrôle, 70 : 7 jours après obstruction, 7R : 7 jours après la levée de l'obstruction, 14R : 14 jours après la levée de l'obstruction. * : $p < 0.05$ lorsque comparé aux contrôles.

Tiré de DiSanto et al., 2003.

1.3.5. Implication dans le phénotype asthmatique

Bien que la relation entre l'asthme et l'expression des isoformes de la myosine ne soit pas clairement établie, plusieurs études tendent à montrer une association entre une augmentation de l'expression de l'isoforme (+)insert et la sévérité du phénotype. Il a été constaté que le muscle lisse des voies respiratoires de patients humains asthmatiques possède une plus grande vélocité que celui de patients sains (Leguillette et al., 2009). Un autre groupe a fait la même observation avec des cellules musculaires lisses de bronches (Bullimore et al., 2011). Une étude a aussi montré que des bronches humaines sensibilisées avec du sérum humain contenant une grande proportion d'IgE (> 1000 U/mL) avaient une vélocité significativement plus importante que les contrôles (Mitchell et al., 1994). À l'aide de souris transgéniques, Babu et al. (2001) suggèrent que le remplacement de l'isoforme (+)insert par (-)insert est associé avec une diminution du taux et de l'importance de la force générée par le tissu musculaire lisse. Enfin, une autre équipe a pu démontrer une augmentation significative de la capacité de contraction et de la vélocité maximale des cellules de

muscles lisses bronchiques dans des modèles humains et canins d'asthme (Ma et al., 2002). Chez l'homme, l'isoforme (+)insert est le seul des deux isoformes dont l'expression est significativement augmentée par rapport à la myosine totale, dans des biopsies endobronchiques de patients asthmatiques (Leguillette et al., 2009). L'isoforme (+)insert serait ainsi associé avec le phénotype de la maladie dans plusieurs modèles d'asthme et serait responsable, du moins en partie, de l'augmentation du potentiel de contraction du muscle lisse des voies respiratoires, entraînant les événements de bronchoconstriction caractéristiques de cette condition et l'expression des signes cliniques. La localisation anatomique, et la réversibilité possible des différents isoformes de la myosine dans l'arbre respiratoire reste jusqu'à ce jour inconnue. Il n'y a également pas de données concernant la modulation de leur expression en fonction de la sévérité de la maladie ou du traitement antiasthmatique utilisé.

2. Chapitre 2 : Article

Présentation sous forme d'article.

Article soumis à l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

Article révisé le

Expression of smooth muscle myosin (+)insert isoform in asthma: A response to extended antigen exposure

Roxane Boivin¹, Amandine Vargas¹, Josiane Lefebvre-Lavoie¹, Mathilde Leclere¹,
Anne-Marie Lauzon², Jean-Pierre Lavoie¹

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of
Montreal, Quebec, Canada;

²Meakins-Christie Laboratory, Department of Medicine, McGill University,
Montreal, Quebec, Canada

Revised Manuscript ()

In preparation for submission to American Journal of Respiratory and Critical Care
Medicine (Research Article)

This work was made possible with support from the Canadian Institutes of Health
Research (CIHR)

Corresponding author:
Dr Jean-Pierre Lavoie
Department of Clinical Sciences
Faculty of Veterinary Medicine
Université de Montréal
CP 5000 Saint-Hyacinthe,
Quebec, Canada, J2S 7C6

2.1. Abstract

Objectives: To determine the anatomical location and kinetics of expression of smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC) (+)insert isoform in asthmatic airways and to evaluate its possible modulation in response to disease status.

Methods: We studied mRNA expression of SMMHC (+)insert isoform in airways (trachea, large, intermediary and small bronchi), of heaves-affected horses, either in clinical exacerbation (n = 6) or remission (n = 3) of the disease, and 8 controls. The reversibility of its expression was evaluated over a 1-year period in endobronchial biopsies of 11 horses with heaves treated with antigen avoidance or a combination of inhaled corticosteroids (ICS) and antigen avoidance. Finally, the kinetics of the SMMHC (+)insert isoform expression was studied in 6 horses with heaves, before and after 1 and 30 days of natural antigen exposure. Gene expression analysis was assessed by qPCR and protein expression was confirmed by targeted mass spectrometry.

Results: SMMHC (+)insert isoform was significantly increased in both large and peripheral airways of heaves-affected horses in clinical exacerbation when compared to horses in clinical remission or controls. Both treatments lead to a significant reduction of (+)insert expression in airways, starting at 3 months. Finally, SMMHC (+)insert isoform was not increased in airways within 1 month of antigen exposition.

Conclusion: The study showed for the first time an increased expression of SMMHC (+)insert isoform throughout the asthmatic airway tree and its reversibility by ICS administration and antigen avoidance. Results suggest that SMMHC (+)insert isoform is implicated in airway bronchoconstriction in response to prolonged antigen exposition.

Keywords: Myosin heavy chain, asthma, (+)insert isoform, smooth muscle, heaves, bronchospasm, horses.

Running Headline: Myosin and asthma

2.2. Introduction

Asthma is a chronic lung disease characterized by variable and recurrent episodes of airway inflammation and obstruction. Clinical signs of the disease result primarily from bronchospasm but mechanisms leading to airway obstruction are still undefined. Smooth muscle contraction involves a complex interaction between numerous molecules, with actin and myosin playing a central role in this process. Hydrolysis of ATP during crossbridge cycle allows myosin to pull and release actin filaments causing contraction and relaxation of smooth muscle fibers. Myosin is a homodimer containing 4 light chains and 2 heavy chains (White et al., 1993). Alternative splicing of the myosin gene produces 4 isoforms of the smooth muscle heavy chain (SMMHC), two of which are in the motor domain of the protein; (-)insert (SMA) and (+)insert (SMB) (Lauzon et al., 1998a; Leguillette et al., 2005; Leguillette and Lauzon, 2006). SMMHC (+)insert isoform contains a 7-amino-acid insert near the ATP binding site that doubles actin propulsion velocity (Lauzon et al., 1998b; Leguillette et al., 2005; White et al., 1993). The expression of SMMHC (+)insert and (-)insert is tissue specific (White et al., 1993). The expression of (+)insert isoform is more important in phasic smooth muscle such as urinary bladder and small intestine, while the (-)insert isoform is expressed in tonic smooth muscle (Gil and Lauzon, 2007; Lauzon et al., 1998a), suggesting that each isoform contributes to the different mechanical properties of these muscles. Modulation of SMMHC (+) and (-)insert isoform was demonstrated during development and pathologies (Babij, 1993; DiSanto et al., 2003). The essential function of (+)insert isoform for smooth muscle contractility was demonstrated with knockout mouse (Leguillette et al., 2005). Recently, it was shown that (+)insert mRNA was overexpressed in endobronchial biopsies of asthmatic patients when compared to controls (Leguillette et al., 2009). Thus, this isoform is suspect to be implicated in airway obstruction by promoting bronchospasm. Moreover (+)insert isoform knockout mouse exhibited an alteration in time course of bronchoconstriction (Tuck et al., 2004). Interestingly, in the urinary bladder and intestine, the expression of (+)insert isoform decreases with urethral and intestinal obstruction (DiSanto et al.,

2003; Lofgren et al., 2002). This process is reversible by restoring a normal function in these organs. Whether (+)insert is present in the smaller airways and the reversibility of its expression is unknown in asthma. In this study we studied heaves-affected horses to first investigate the anatomical location of the SMMHC (+)insert isoform within the airways and its expression during clinical exacerbation and remission of the disease. Equine (+)insert isoform was determined from equine genome, by sequence homology with other species (Annexe A1), and confirmed by sequencing. We then evaluated the reversibility of its expression by studying prospectively the same horses, while receiving two different treatments (antigen avoidance or inhaled corticosteroids) over 1-year period. Finally, we investigated the appearance kinetics of this isoform in airways by following a group of horses with heaves and controls before and after one month of a continuous natural antigenic challenge.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Experimental design and animals

Twenty-six adult horses (394-580 kg, 12-27 years of age) including 18 mares and 8 geldings were studied. Sixteen horses with heaves had a history of recurrent episodes of airway obstruction upon hay exposure, abnormal respiratory mechanic measurements (pulmonary resistance (R_L) > 1 cm H₂O/L/sec), and increased neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid ($\geq 25\%$). Control horses (n=10) had no history of respiratory diseases, normal respiratory mechanic measurement ($R_L < 1$ cm H₂O/L/sec) and $< 25\%$ of neutrophils in BAL fluid with stabling and hay feeding. Horses were deemed otherwise healthy, based on physical examination, blood count, and biochemistry. Detailed description of the animals, their airway function and lung inflammation are presented in Table I. All experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and were approved by the Animal Care Committee for the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal.

2.3.2. Pulmonary function

Lung function was measured in unsedated horses, using a heated pneumotachograph attached to a mask, and an oesophageal balloon catheter following a previously described method (Jean et al., 1999).

Table I: Description of the animals, airway function and lung inflammation

| Group | Age (years) | Weight (Kg) | Sex | Airway Resistance after antigen challenge (cm H ₂ O/L/sec) | Neutrophils count in BAL ¹ after antigen challenge (%) |
|----------------|-------------|-----------------|---------|---|---|
| Control | 15 | 497 | Mare | 0.52 | 18 |
| Control | 16 | 475 | Mare | 0.81 | 1 |
| Control | 18 | 394 | Gelding | 0.87 | 2 |
| Control | 18 | 425 | Mare | 0.38 | 4 |
| Control | 19 | 494 | Gelding | 0.43 | 2 |
| Control | 22 | 444 | Mare | 0.44 | 1 |
| Control | 23 | 490 | Mare | 0.47 | 24 |
| Control | 27 | 508 | Mare | 1.02 | 8 |
| Control | 16 | 453 | Mare | 0.53 | 18 |
| Control | 12 | NA ² | Mare | 0.30 | 2 |
| Heaves | 18 | 443 | Mare | 2.63 | 37 |
| Heaves | 20 | 452 | Mare | 2.87 | 42 |
| Heaves | 20 | 506 | Gelding | 2.37 | 64 |
| Heaves | 23 | 442 | Gelding | 2.02 | 37 |
| Heaves | 21 | 477 | Gelding | 1.83 | 38 |
| Heaves | 26 | 480 | Mare | 3.44 | 32 |
| Heaves | 22 | 440 | Mare | 2.12 | 42 |
| Heaves | 14 | 580 | Mare | 3.83 | 25 |
| Heaves | 17 | 546 | Mare | 2.49 | 36 |
| Heaves | 20 | 570 | Gelding | 2.10 | 63 |
| Heaves | 17 | 555 | Gelding | 3.07 | 25 |
| Heaves | 23 | 475 | Mare | 4.37 | 48 |
| Heaves | 19 | 472 | Mare | 1.70 | 35 |
| Heaves | 19 | 491 | Mare | 2.39 | NA |
| Heaves | 16 | 462 | Mare | 3.27 | 20 |
| Heaves | 20 | 444 | Gelding | 2.15 | 42 |

¹ Bronchoalveolar lavage² Not available

2.3.3. Bronchoalveolar lavages

Bronchoalveolar lavages (BAL) were performed using 500 ml boluses of isotonic saline instilled in the main bronchi through a 2.5 m videoendoscope (Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan), as previously described (Lavoie et al., 2001). Thin-layer cell from BAL fluid were prepared with a cytocentrifuge Cytospin2 (Shandon, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 1000 rpm for 5 minutes and stained with a modified Wright-Giemsa (DiffQuick, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Differential cell counts were obtained from a count of 400 cells.

2.3.4. Treatments

Study 1

Control (n = 8) and heaves-affected (n = 6) horses were exposed to antigen while being stabled and fed hay for at least 3 weeks. Three additional heaves-affected horses were pastured for a minimum of 3 months (remission group). Animals were sacrificed by using an overdose of pentobarbital sodium (Vetoquinol, Lavaltrie, QC, CA) and the lungs and trachea were removed. Airways and smooth muscles were then dissected as described below.

Study 2

Animals and treatments in this study were previously described (Leclere et al., 2012). Briefly 11 adult heaves-affected horses were housed indoors and exposed to hay until they all exhibited clinical signs suggesting airflow obstruction (Baseline). The antigen avoidance group consisted of 5 horses at pasture without hay feeding as sole therapy. The remaining 6 horses were treated with inhaled corticosteroids (Fluticasone group) while being stabled and exposed to hay for the first 6 months, and then turned out on pasture for the second half of the study with continued treatment with fluticasone (Annexe A2). Pulmonary function, bronchoalveolar lavage fluids and endobronchial biopsies (see below) were collected when horses had been exposed to hay for > 1 month (Baseline) and after 1,

3, 6, 7 and 12 months of treatment.

Study 3

Animals and procedures for this study were previously described (Leclere et al., 2011a). Briefly, 6 horses with heaves and 5 age-matched controls were kept in an antigen poor environment (pasture) ≥ 3 months prior to study. Both groups were then stabled and fed hay for a month. Endobronchial biopsies were collected prior to antigen exposure then 24 h and 30 days following exposure.

2.3.5. Tissues

Aorta, urinary bladder, intestine and uterus

Tissues were removed from horses at necropsy, immediately placed in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

Airways and smooth muscle

Airways were manually dissected from the surrounding parenchyma, placed in liquid nitrogen, then classified as peripheral airways (≤ 10 mm of diameter), or intermediate airways (between 10-25 mm of diameter) and stored at -80 °C. Bronchial and tracheal smooth muscle were dissected on ice and stored at -80 °C.

Endobronchial biopsies

Biopsies were performed using disposable forceps (Standard fenestrated and smooth, 2.3 m, Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japan), from different branching sites, starting approximately 30 cm distal to the carina and moving cranially (Leclere et al., 2011a). Endobronchial biopsies were placed in RNAlater® solution (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 24 h at 4 °C then stored at -80 °C.

2.3.6. mRNA extraction

To quantify SMMHC (+)insert and (-)insert isoforms, horse total mRNA was extract from the following frozen tissues: aorta, urinary bladder, intestine,

uterus, peripheral airways, intermediate airways, bronchial smooth muscle and tracheal smooth muscle. Approximately 100 mg of each tissue were homogenized using PowerGen 125 and a probe 3850 in 1 mL of TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and mRNA extraction was performed according to manufacturer's instructions. mRNA was extracted from 2 endobronchial biopsies for each horse using RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, CA) according to manufacturer's instructions. RNA was quantified using a spectrophotometer NanoDrop ND1000 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3.7. Reverse transcription

For each sample, either 1 µg or 500 ng (endobronchial biopsies) of total mRNA were reverse transcribed in a total reaction volume of 20 µL with 1 µL of RNAsin 10,000 U (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL of oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer 0.5 µg/µL, 1 µL of Superscript III 200 U/µL, 1 µL of dNTP Mix 10 mM, 4 µL of Buffer First-Strand 5X, and 1 µL of DTT 0.1 M (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reverse transcription reactions were done at 65 °C for 5 minutes, 50 °C for 60 minutes and 70 °C for 15 minutes with appropriate no RT control. All reactions were purified with NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's instructions. Products were eluted in 30 µL of UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All samples were reverse transcribed and purified in duplicate, i.e., two repeats of the same mRNA sample.

2.3.8. Quantitative real-time PCR

To quantify SMMHC (+) and (-) insert isoforms, and total SMMHC, the cDNA generated as above were amplified by real-time PCR. The 21 bp (+)insert sequence itself served as the insert forward primer. The (-)insert forward primer spanned the insert junction. The sequences of the primers were as follow: (+)insert isoform: forward primer 5'-ATTCTATGCACAGGCGAGTCTGGA-3' and reverse primer 5'-GTAGGCAAGAGGTGGGCCTTG-3' (amplicon 135 bp), (-)insert

isoform: forward primer 5'-ATTCTATGCACAGGCGAGTCTGGA-3' and reverse primer 5'-TTTCCAGCTCACCCGTGATGCTG-3' (amplicon 127 bp). Primers for total SMMHC were designed by targeting a region common to all SMMHC isoforms as follow: total SMMHC forward primer 5'-TGAACAAGGCCCTGGACAAGAC-3' and reverse primer 5'-TGCAGCTTCTCGTTGGTGTAGT-3' (amplicon 133 bp). Relative expression of (+)insert was therefore quantified by reporting the content of this isoform to the content of (-)insert or total SMMHC. PCR reactions were performed using QuantiTect®SYBR® Green PCR kit (Qiagen, Toronto, ON, CA) in a volume of 20 µL, with 2 µL of purified cDNA, 0.5 µM of each primer for (+)insert and 0.55 µM for (-)insert and total SMMHC. All PCR reagents were prepared by an automated pipettor (epMotion5070 Eppendorf, Hamburg, Germany). Samples were amplified in a RotorGene 3000 system (Corbett Research, Sydney, AS). The real-time PCR conditions consisted of a denaturation step of 10 min at 95 °C, followed by an amplification of 45 cycles (denaturation at 95 °C for 15 sec, annealing at 57 °C for 20 sec for (-)insert and total SMMHC and 58 °C for 20 sec for (+)insert, and extension at 72 °C for 25 sec) and one melting curve. PCR reactions were performed in duplicate, i.e., two repeats on the same mRNA sample. Each primer set generated only one PCR product, and the identity and integrity of these products were confirmed by sequencing.

2.3.9. (+) and (-)insert relative quantitative protein analysis

Proteins were extracted from horses' bronchial smooth muscle. Approximately 200 mg of bronchial smooth muscle were homogenized in 2 mL of Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 20 µL of 0.5 M EDTA and 20 µL of 100X phosphatase and proteinase inhibitor cocktail (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Tissues were homogenized as described above and samples were centrifuged for 5 minutes at 10,000 g. Supernatants were collected and protein quantification was determined by a standard Bradford assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was done

through 10% SDS polyacrylamide precast gel with a Laemmli buffer system (BioRad, Hercules, CA, USA). Thirty micrograms of each sample were loaded on the gel. Proteins were then stained with coomassie blue (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Bands of interest were extracted from gels and sent to the proteomics platform in Quebec Genomics Center (Quebec, CAN) where targeted mass spectrometry was performed to determine the relative content in (+) and (-)insert isoform protein with the Multiple Reaction Monitoring (MRM) technique.

Protein in-gel digestion

Bands were placed in 96-well plates and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of Shevchenko et al. (1996) with the modifications suggested by Havlis et al. (2003). Briefly, proteins were reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126 nM of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) at 58 °C for 1 h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended into 7 µL of 0.1% formic acid and 2 µL were analyzed by mass spectrometry (MS).

Stable isotope-labeled standards (SIS) peptides

Purified synthetic peptides containing [¹³C₆]Lys and [¹³C₆]Arg (Thermo Fisher Scientific, Ulm, Germany) were reconstituted in 0.1% formic acid to a final concentration of 50 pmol/µL. A solution containing 2 pmol/µL of DTSITGELE [Lys(13C6; 15N2)] and 20 pmol/µL of DTSITQGPPLAYGELE [Lys(13C6; 15N2)] was prepared from the stock solutions and used to reconstitute the samples after tryptic digestion for relative quantification.

Multiple reaction monitoring (MRM) analysis

Samples were analyzed on a ABSciex 5500QTRAPTM hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer equipped with an Eksigent nanoLC AS2 cHiPLC nanoflexcontrolled by Analyst 1.6TM and with a nanospray ionization source. Mass spectrometry analysis was conducted in positive ion mode with an ion spray voltage of 2300 V. For each samples, 5 μ L were injected. Peptides were desalted on a 200 μ m x 6 mm chip trap column packed with ChromXP C18, 3 μ m, (Eksigent part of ABSciex, Dublin, CA, USA) at 2 μ L/min of Solvent A (formic 0.1%) then switched in line at a flow rate of 1000 nL/min on a 200 μ m x 15 cm chip column packed with ChromXP C18, 3 μ m (Eksigent part of ABSciex, Dublin, CA, USA) with a 16 min linear gradient from 5 to 25% of solvent B (ACN 0.1% FA), then a 2 min linear gradient from 25 to 80% B, followed by a 2 min linear gradient. Cycle time was 2.24 sec. Nebulizer gas was set to 8 (Gas1), curtain gas to 20 and heater to 150 °C. Preset values for declustering potential (Watanaveeradej et al., 2011) and collision energy (CE) were used. LC-MRM/MS analyses were performed using all the transitions from y and b ions with m/z greater than the precursor for each peptide. Quantification was done with MultiQuant 2.1 and based on the relative areas of the SIS and endogenous peptides. The MRM transition that gave the highest area counts was used for the quantitation, with the other transitions acting as qualifier transitions to confirm peptide retention times and the fragment ion ratios. A blank solvent injection was run between biological samples to prevent sample carryover on the high performance liquid chromatography (HPLC) column and the samples were injected in random order. Samples were analyzed in duplicate, i.e., two repeats of the same protein sample.

2.3.10. Statistical analysis

Statistical analysis of the replicated measurement was performed as follow: For study 1, group characteristics (age, weight, gender) were analyzed by Mann-Whitney test and physiologic data (pulmonary function and percentage of neutrophils in BAL) by one-way ANOVA with Turkey's post-hoc test. The

(+)insert isoform to (-)insert and total SMMHC was analyzed by a linear model of repeated-measure with “group” as a between-subject factor and “tissue” as within-subject factor. Within and between groups differences were further evaluated using *a priori* contrasts with Bonferroni corrections. Protein data were also analyzed by one-way ANOVA with Turkey’s post-hoc test. For study 2, data were evaluated by repeated-measure ANOVA with *a priori* contrasts and Bonferroni corrections, with “time” as a between-subject factor and “treatment” as within-subject factor. For study 3, data were evaluated by repeated-measure ANOVA with *a priori* contrasts with “time” as a between-subject factor and “group” as within-subject factor. The software SAS version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) was used, and $P < 0.05$ was considered significant.

2.4. Results

2.4.1. Animals

Study 1

Age, weight and sex were not statistically different between groups (Control (mean \pm SD): 19.8 \pm 1.4 years, Heaves: 21.3 \pm 1.1 years, Remission: 20.3 \pm 1.3 years; 466 \pm 14, 467 \pm 10 and 501 \pm 27 kg; and 2/8, 3/6 and 1/3 mares.

Study 2 and 3

Age, weight, and proportion of mares were not statistically different between groups as previously reported (Leclere et al., 2011a; Leclere et al., 2012).

2.4.2. Pulmonary function & bronchoalveolar lavage cytology

Study 1

All horses with heaves had evidence of airway obstruction ($R_L > 1$ cm H₂O/L/sec), while horses with heaves in clinical remission and control horses had normal lung function ($R_L < 1$ cm H₂O/L/sec) (Figure 2.1.A). Percentage of neutrophils in BAL fluid cytology of horses with heaves was significantly higher when compared to controls ($p < 0.0001$) and to horses with heaves in clinical remission ($p = 0.0002$) (Figure 2.1.B).

Study 2

Both groups of heaves-affected horses demonstrated airway obstruction and airways neutrophilia at baseline. In the antigen avoidance group, neutrophils had returned to normal by Month 6. In the ICS group, however, pulmonary neutrophilia only decreased after antigen exposure ceased (Leclere et al., 2012) (Annexe A3).

Study 3

Lung function of horses with heaves was not different from that of control horses at baseline. Antigenic exposure induced significant airway obstruction only in diseased animals (Leclere et al., 2011a) (Annexe A4). Antigenic exposure induced a sustained increase in the percentage of neutrophils in horses with heaves after 1 and 30 days, while it was transitory in control horses (Leclere et al., 2011a).

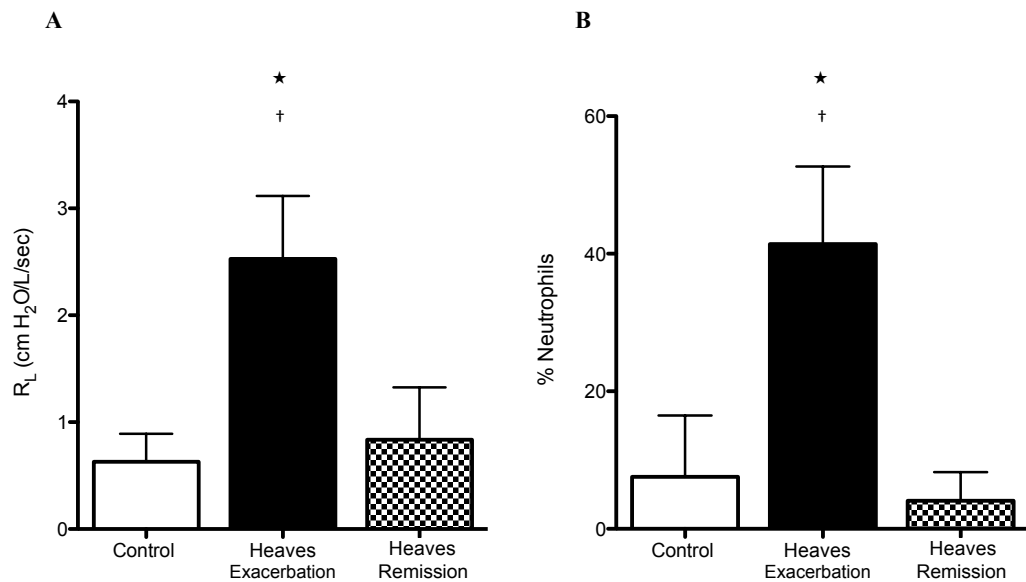


Figure 2.1. Physiological data of horses of Study 1. (A) Pulmonary resistance (R_L) and (B) percentage of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of control horses (open bars; n = 8), heaves-affected horses in clinical exacerbation (solid bars; n = 6) and in clinical remission (chess bars; n = 3). Values represent mean \pm SD. *: Different from controls; †: Different from horses in remission.

2.4.3. Quantitative real-time PCR

(+)insert expression in horses organs

SMMHC (+)insert cDNA was found in all tissues, but it was predominant in organs containing phasic smooth muscles. Thus, expression of (+)insert/(-)insert

was significantly lower in aorta when compared to small intestine ($p = 0.004$), uterus ($p = 0.01$) and urinary bladder ($p < 0.0001$) (Annexe A5.A). When reported on total SMMHC, aorta showed a significantly lower expression of (+)insert when compared to other organs ($p < 0.0001$) (Annexe A5.B). Expression of (+)insert isoform was not different between urinary bladder, uterus and small intestine.

(+)insert is increased during clinical exacerbation of the disease

When reported as a ratio to (-)insert expression, the (+)insert isoform was significantly increased in bronchial smooth muscle of heaves-affected horses when compared to control horses ($p < 0.0001$) and to horses in clinical remission ($p < 0.0001$) (Figure 2.2). Similar findings were observed in intermediate ($p = 0.0002$) and peripheral airways ($p = 0.0009$) when compared to controls, and to horse in clinical remission ($p < 0.0001$ in intermediate airways and $p = 0.0008$ in peripheral airways). mRNA expression of (+)insert isoform was 3-4 times greater in airways of heaves-affected horses when compared to controls. The expression of (+)insert was not significantly different between the three groups in tracheal smooth muscles, however. Expression of the SMMHC (+)insert isoform was also determined at protein level by targeted mass spectrometry in bronchial smooth muscle of horses from study 1 (Figure 2.3). The protein was expressed in all samples. The (+)insert protein was significantly increased in the bronchi of heaves-affected horses when compare to control ($p = 0.02$), but not during clinical remission of the disease. (+)insert protein expression was 3 times greater in bronchial smooth muscle in horses with heaves in clinical exacerbation when compared to controls. There was no significant difference between control horses and horses in remission for protein expression ($p = 0.48$), however. When reported on total SMMHC, (+)insert isoform mRNA was significantly increased in bronchial smooth muscle of horses with heaves in crisis when compared to controls ($p < 0.0001$) and horses in remission ($p < 0.0001$) (Figure 2.4). Intermediate airways of heaves-affected horses had a (+)insert expression significantly higher than horses in remission ($p < 0.0001$) and controls ($p = 0.0005$). The (+)insert expression was significantly increased in peripheral airways of horses with heaves when compared to remission group ($p =$

0.002) but not with controls ($p = 0.004$, not significant after adjustment). There was no significant difference in (+)insert isoform expression between groups in tracheal smooth muscle.

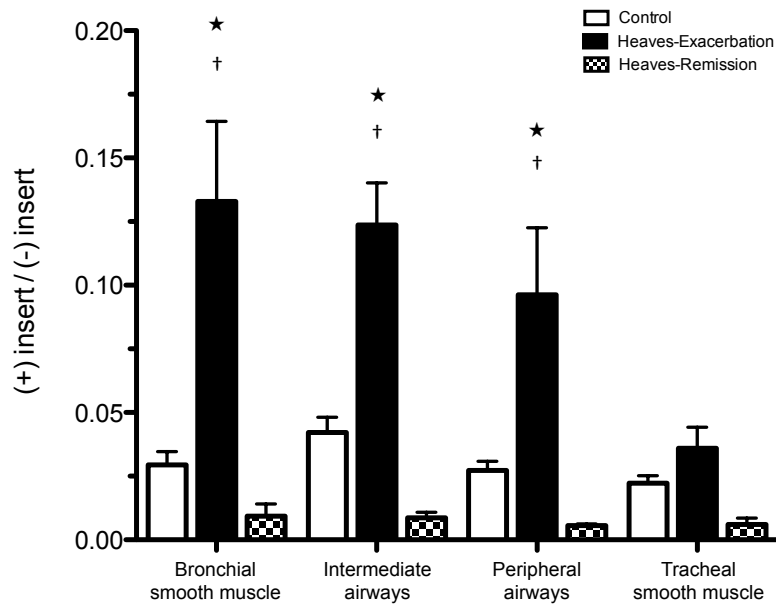


Figure 2.2. mRNA expression of myosin (+)insert isoform in horses' airways reported on (-)insert isoform expression. Total RNA was extracted from airways of control horses (open bars; $n = 8$), heaves-affected horses in clinical exacerbation (solid bars; $n = 6$) and heaves-affected horses in clinical remission (chess bars; $n=3$). Expression of (+) and (-)insert isoform was analyzed by real-time PCR with appropriate negative control. Expression of (+)insert was then reported on expression of (-)insert to obtain a ratio. Values represent the mean value \pm SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same RNA sample. *: Different from control horses; †: Different from horses in remission.

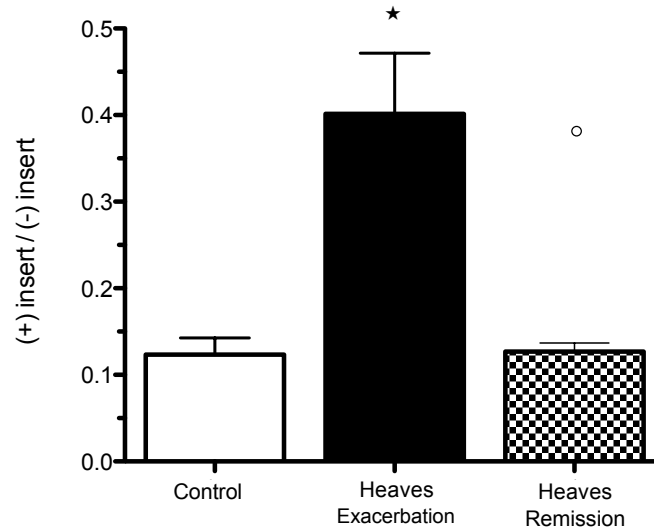


Figure 2.3. Protein expression of myosin (+)insert isoform in horses' bronchial smooth muscle.

Proteins were extracted from bronchial smooth muscle of control horses (open bars; n = 8), heaves-affected horse in clinical exacerbation (solid bars; n = 6) and heaves-affected horses in clinical remission (chess bars; n = 3). Protein expression of (+) and (-)insert isoform was analyzed by mass spectrometry with appropriate negative control. Expression of (+)insert was reported on expression of (-)insert to obtain a ratio. Values represent the mean value \pm SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same protein sample. *: Different from control horses. °:outlier.

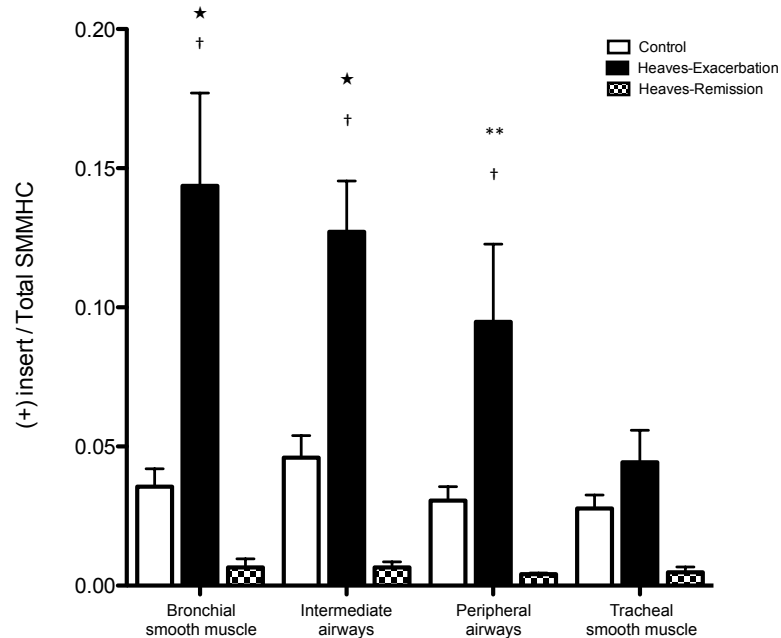


Figure 2.4. mRNA expression of myosin (+)insert isoform in horses' airways reported on total SMMHC. Total RNA was extracted from airways of control horses (open bars; n = 8), heaves-affected horse in clinical exacerbation (solid bars; n = 6) and heaves-affected horses in clinical remission (chess bars; n = 3). Expression of (+)insert isoform and total SMMHC was analyzed by real-time PCR with appropriate negative control. Expression of (+)insert was then reported on expression of total SMMHC to obtain a ratio. Values represent the mean value \pm SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same RNA sample. *: Different from control horses; †: Different from horses in remission; **: Different from controls, but not after adjustment.

Reversibility of (+)insert expression with the remission of the disease

To determine whether the expression of SMMHC (+)insert was reversible, we studied endobronchial biopsies of heaves-affected horses treated with fluticasone or antigen avoidance (Study 2, Figure 2.5). Results indicate no significant difference in proportion of (+)insert mRNA expression between groups throughout the study. Data also showed that both treatments lead to a significant reduction of (+)insert isoform following a year of treatment ($p < 0.0001$). After a month of treatment, there was no change in (+)insert isoform expression in airways of horses. However,

both groups demonstrated a normalized pulmonary function (Annexe A3.A), but with a persisting airway neutrophilia (Annexe A3.B). After 3 months of treatment, there was a significant decrease in (+)insert expression in fluticasone group ($p = 0.003$), without concurrent improvement in airway neutrophilia. In antigen avoidance group, we observed a normal neutrophil count, and a non significant decrease of (+)insert expression ($p = 0.02$, not significant after adjustment). However, both groups had maintained their normal pulmonary function. By 6 months of treatment, antigen avoidance group showed a significant decrease in (+)insert expression ($p = 0.001$) and a normal neutrophil count. In fluticasone group, (+)insert expression was maintained at a low level, while neutrophils counts remained high. At the end of the study, pulmonary mechanics and BAL cytology were returned to normal for all horses, with a similar level of (+)insert expression.

(+)insert do not increase within a month of exposure

Results showed no difference in (+)insert isoform proportion in both groups throughout the study period. However, after 30 days of exposure, 2/6 of horses with heaves presented an increased expression of (+)insert isoform in endobronchial biopsies (study 3, Figure 2.6).

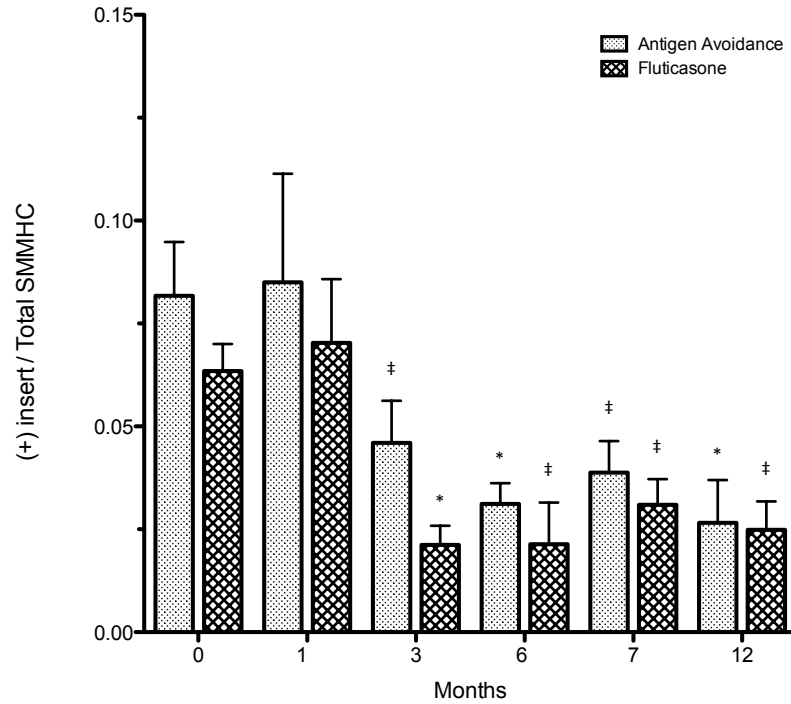


Figure 2.5. Reversibility of myosin (+)insert isoform expression in horses' endobronchial biopsies. Total RNA was extracted from two endobronchial biopsies of heaves-affected horses either treated with antigen avoidance (light gray bars; n = 5) or inhaled corticosteroids (dark gray bars; n = 6) for a year and stabled the first 6 months, and then turned out on pasture for the second half of the study. Expression of (+)insert isoform and total SMMHC was analyzed by real-time PCR with appropriate negative control. Expression of (+)insert was reported on expression of total SMMHC to obtain a ratio. Values represent the mean value \pm SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same RNA sample. *: Different from baseline (month 0) in the same group. ‡: Different from baseline (month 0) in the same group, but not significant after Bonferonni correction.

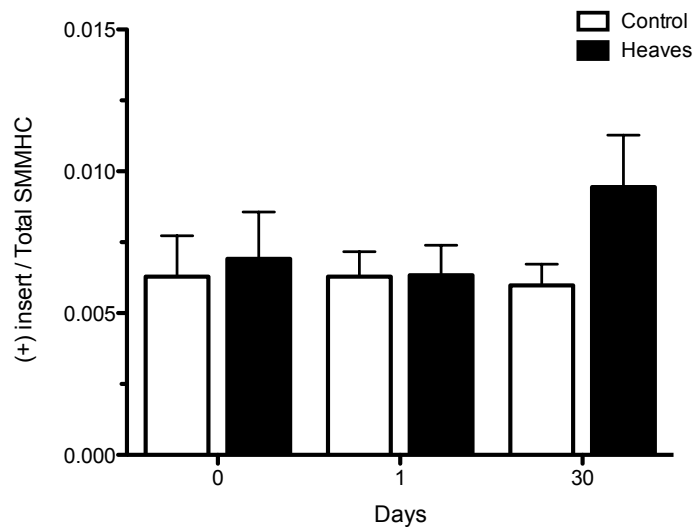


Figure 2.6. Kinetics of myosin (+)insert isoform expression in horses' endobronchial biopsies. Total RNA was extracted from two endobronchial biopsies of controls (open bars; n = 5) and heaves-affected horses (solid bars; n = 6) kept in an antigen free environment ≥ 3 months prior to study, then stabled for a month. Expression of (+)insert isoform and total SMMHC was analyzed by real-time PCR with appropriate negative control. Expression of (+)insert was reported on expression of total SMMHC to obtain a ratio. Values represent the mean value \pm SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same RNA sample.

2.5. Discussion

Bronchoconstriction is a hallmark of human asthma, but the mechanisms leading to it remains elusive. Given their contractile properties, much interest has been on factors possibly contributing to the increased airway smooth muscle mass (ASM) observed in asthmatic patients. A recent study reported an altered composition of ASM, with an increased expression of the fast contracting SMMHC (+)insert isoform in the central airways of asthmatic subjects which could also accentuate the bronchoconstriction (Leguillette et al., 2009). Sequence of the (+)insert is very conserved between species, which supports the biological importance of the protein. Results of the present study demonstrate for the first time, that in asthmatic horses, SMMHC (+)insert isoform is overexpressed in both large and small airways and that its expression is reversible within the airways, and coincides with the improvement in lung function. However, the expression of this isoform was not modulated by disease status in tracheal smooth muscle. Taken together, these results indicate a potential implication of SMMHC (+)insert isoform in bronchoconstriction, and that tracheal smooth muscle alterations may not be representative of changes occurring in the bronchial tree.

We choose to study horses with heaves to address the contribution of the fast contracting SMMHC (+)insert isoform in the asthmatic airways, as this model is unique in allowing prospective studies in the asymptomatic and symptomatic stages of disease in the same animals, an approach difficult in humans, and not possible in other animal models. Similarly to human asthma, heaves is a spontaneously occurring chronic disorder of the airways, which is characterized by variable and recurring airflow obstruction, airway inflammation, bronchial hyperresponsiveness, and smooth muscle remodelling. During the exacerbation state of the disease, horses present increased respiratory efforts at rest, coughing and exercise intolerance (Leclere et al., 2011b). As in human bronchial asthma, clinical improvement is observed in affected horses either with corticosteroids or bronchodilators. Size of the animals also allows macroscopic dissection of bronchial smooth muscle, contrarily to smaller animal models, as rodents. As seen in human tissues

(Leguillette et al., 2005), (+)insert isoform was predominant in phasic tissues of horses. Thus, as expected, we observed a greater amount of (+)insert isoform in urinary bladder and small intestine, as they frequently contract, compare to aorta, a more tonic tissue (Annexe A5).

(+)insert expression in the asthmatic lungs

Previous studies have demonstrated that the presence of the SMMHC (+)insert doubles propulsion velocity of actin filament (Lauzon et al., 1998b; Leguillette et al., 2008). It suggests that a differential expression of this isoform could account for altered contractile properties observed in the asthmatic airway smooth muscle (Lauzon et al., 1998a). In the present study, we established that (+)insert isoform is expressed in the entire bronchial tree, from trachea to most peripheral airways, but its expression varies according to disease status. We observed that (+)insert isoform was increased in both large and small airways of horses with heaves, with no differential expression with the size of airways. These findings are concordant with the distribution pattern of smooth muscle thickening (remodelling) found in type II human asthmatics (Ebina et al., 1990), and in airways of all calibers in heaves-affected horses (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011b). We can then postulate that in addition to the increase in the amount of airway smooth muscles in asthma, smooth muscle myocytes undergo phenotypic changes by switching to a phasic phenotype overexpressing (+)insert isoform. Tracheal smooth muscle was the only tissue that didn't show a differential expression of this isoform with the disease state, which is in agreement with the hypothesis that this tissue may not be implicated in the disease. This also suggests that trachea may not reflect what's happening in the bronchial tree in our model, and in human asthma.

(+)insert isoform modulation

In this study, we showed that the disease status modulates the (+)insert isoform expression. During clinical exacerbation, there is a switch of airway smooth muscle from tonic to phasic state as indicated by an increased ratio of (+)insert/(-)

insert isoform and (+)insert/total SMMHC. Results from study 1 also support the concept that overexpression of (+)insert in airways is not a constitutive event, as it was indicated with its reduced expression when horses with heaves are in clinical remission of the disease. This was confirmed when studying endobronchial biopsies of the same horses during exacerbation of heaves and then, when in clinical remission of the disease induced either by removal of antigen exposure (study 2 and study 3), or treatment with inhaled fluticasone (study 2), a common anti-asthma medication. Inhaled fluticasone, despite continued antigen exposure and persistent neutrophilic airway inflammation, was associated with a more rapid improvement (3 months) in airway function than with antigen avoidance as sole therapy (Leclere et al., 2012). Moreover, the decrease in SMMHC (+)insert isoform was accelerated with administration of fluticasone, as it had been shown for the ASM mass (Leclere et al., 2012). As airway obstruction, but not inflammation, was more rapidly controlled by inhaled fluticasone than from antigen withdrawal (Leclere et al., 2012), the mechanical properties of the airways may contribute to the SMMHC isoform switching. These findings are also in agreement with, and further extend previous findings that mechanical obstruction alone may suffice for the modulation of the (+)insert isoform expression in the intestine and the urinary bladder (DiSanto et al., 2003; Lofgren et al., 2002).

The decrease of (+)insert isoform in the study 2 coincides with an improvement in airway function previously reported in these horses (Leclere et al., 2012). However, we did not observe a significant correlation between the (+)insert isoform and values of pulmonary resistance or elastance (data not shown). Other studies had also fail to identify a correlation between presence of (+)insert and mechanical properties of smooth muscle in other tissues (Calovini et al., 1995; Haase and Morano, 1996; Siegman et al., 1997). We propose that this may be due to additional regulatory processes that are modulating the bronchoconstriction. The correlation probably exists, as proposed by the increased velocity of the (+)insert isoform *in vitro* (Kelley et al., 1993; Lauzon et al., 1998a), but is still hard to demonstrate *in vivo* probably because of the multiple interactions between numerous factors such as inflammatory mediators, seasons changes, hormone

levels, inter-individual variation in responsiveness to treatment, connective tissue attachments, etc. Evaluation of mechanical performance in greater groups of heaves-affected horses, in a well-controlled environment would probably get us data that better correlate.

Kinetics

Although airway remodelling in asthma is generally believed to be a consequence of repeated cycles of damage and repair processes due to inflammation, recent reports suggest that it may be an early event. There is currently no data on the appearance kinetics of airway smooth muscle remodelling following an antigen exposure in human asthma although it is not a constitutive event (Barbato et al., 2006; Payne et al., 2003). It may occur as early as 4 years of age in asthmatic patients, but its presence was not demonstrated in infants at 1 year of age (Durrani et al., 2011). This suggests that remodelling process, including changes in contractile proteins expression, happens in the first years of antigen exposition in parallel of clinical symptoms development. Although the kinetic of alterations in contractile ASM protein expression is unknown in asthma, this process may be rapidly modulated in response to antigen exposure.

In the study 3, we confirmed that (+)insert isoform was not increased after 30 days of antigen exposure in airways of horses with heaves (Figure 2.6) whereas horses were in clinical exacerbation and had an increased airway neutrophilia (Annexe A4). However, results in study 2 suggest that its expression may increase in more than a month period, indicating that the increased or decreased expression of (+)insert isoform gene is a chronic event occurring only after several months of exposition or antigen avoidance/treatment. Taken together, these results suggest that (+)insert isoform is a mechanism engaged in response to extended antigen exposition, as other defensive processes (increased smooth muscle mass, mucus production, bronchospasm, etc.) are not sufficient to stop antigen infiltration in airways. Switching to a phasic state would then allow a greater narrowing of airways by increasing smooth muscle velocity contraction. Thus, (+)insert isoform would not be directly implicated in the initial clinical symptoms, but its expression

would be enhanced by prolonged antigen exposition. Persistent inflammation may also have a long-term effect on (+)insert isoform expression. Overexpression of (+)insert isoform may also be a consequence of increase ASM mass, as smooth muscle cells would need a stronger contraction to narrow the airways. Moreover, dynamic obstruction caused by a cyclic bronchoconstriction may also modulate SMMHC (+)insert expression in airways. As it was demonstrated *in vitro*, airway smooth muscle cells respond to oscillatory force with an increased stiffness and a reorganisation of its contractile proteins network (Nagayama and Matsumoto, 2010); this could include an increased expression of SMMHC (+)insert isoform. Finally, because of the increased stiffness of the asthmatic airways (Johns et al., 2000; Wilson et al., 1993), smooth muscle cells may turn on a phasic state to ensure proper contraction of the airways.

2.6. Conclusion

In summary, we showed that SMMHC (+)insert isoform is increased in bronchial smooth muscle both at mRNA and protein levels of heaves-affected horses, a natural model of asthma. Furthermore, we demonstrated that its expression was reversible either by antigen avoidance and administration of inhaled corticosteroids. Finally, based on the reversibility of its expression, we conclude that appearance of (+)insert isoform is a chronic event, requiring at least a few months to become established. We suggest that (+)insert isoform expression is part of a protective mechanism enhanced in response to a prolonged antigen exposure. Considering that cycling bronchoconstriction may contribute to increase (+)insert expression, the capacity of bronchodilators to prevent or reverse overexpression of (+)insert isoform in airways should be investigated as the signalling pathways implicated in modulation of (+)insert isoform gene expression in asthma.

2.7. Acknowledgments

The authors thank Isabelle Kelly for mass spectrometry experiment and Guy Beauchamp for statistical analysis.

2.8. References

- Babij, P., 1993, Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing of a visceral isoform of smooth muscle myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res* 21, 1467-1471.
- Barbato, A., Turato, G., Baraldo, S., Bazzan, E., Calabrese, F., Panizzolo, C., Zanin, M.E., Zuin, R., Maestrelli, P., Fabbri, L.M., Saetta, M., 2006, Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 975-981.
- Calovini, T., Haase, H., Morano, I., 1995, Steroid-hormone regulation of myosin subunit expression in smooth and cardiac muscle. *J Cell Biochem* 59, 69-78.
- DiSanto, M.E., Stein, R., Chang, S., Hypolite, J.A., Zheng, Y., Zderic, S., Wein, A.J., Chacko, S., 2003, Alteration in expression of myosin isoforms in detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1397-1410.
- Durrani, S.R., Viswanathan, R.K., Busse, W.W., 2011, What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J Allergy Clin Immunol* 128, 439-448; quiz 449-450.
- Ebina, M., Yaegashi, H., Chiba, R., Takahashi, T., Motomiya, M., Tanemura, M., 1990, Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles. A morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 141, 1327-1332.
- Gil, F.R., Lauzon, A.M., 2007, Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Can J Physiol Pharmacol* 85, 133-140.
- Haase, H., Morano, I., 1996, Alternative splicing of smooth muscle myosin heavy chains and its functional consequences. *J Cell Biochem* 60, 521-528.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75:1300-1306.
- Herszberg, B., Ramos-Barbon, D., Tamaoka, M., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2006, Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 118, 382-388.
- Jean, D., Vrins, A., Lavoie, J.P., 1999, Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 60, 1341-1346.
- Johns, D.P., Wilson, J., Harding, R., Walters, E.H., 2000, Airway distensibility in healthy and asthmatic subjects: effect of lung volume history. *J Appl Physiol* 88, 1413-1420.
- Kelley, C.A., Takahashi, M., Yu, J.H., Adelstein, R.S., 1993, An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem* 268, 12848-12854.
- Lauzon, A.M., Trybus, K.M., Warshaw, D.M., 1998a, Molecular mechanics of two smooth muscle heavy meromyosin constructs that differ by an insert in the motor domain. *Acta Physiol Scand* 164, 357-361.

- Lauzon, A.M., Tyska, M.J., Rovner, A.S., Freyzon, Y., Warshaw, D.M., Trybus, K.M., 1998b, A 7-amino-acid insert in the heavy chain nucleotide binding loop alters the kinetics of smooth muscle myosin in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 825-837.
- Lavoie, J.P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G., Hamid, Q.A., 2001, Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1410-1413.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Gelinas-Lymburner, E., David, F., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2011a, Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 181-187.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Joubert, P., Relave, F., Setlakwe, E.L., Beauchamp, G., Couture, C., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2012, Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 589-596.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., 2011b, Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16, 1027-1046.
- Leguillette, R., Gil, F.R., Zitouni, N., Lajoie-Kadoch, S., Sobieszek, A., Lauzon, A.M., 2005, (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1277-1285.
- Leguillette, R., Lauzon, A.M., 2006, (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B): from single molecule to human. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1862-1874.
- Leguillette, R., Laviolette, M., Bergeron, C., Zitouni, N., Kogut, P., Solway, J., Kachmar, L., Hamid, Q., Lauzon, A.M., 2009, Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 194-204.
- Leguillette, R., Zitouni, N.B., Govindaraju, K., Fong, L.M., Lauzon, A.M., 2008, Affinity for MgADP and force of unbinding from actin of myosin purified from tonic and phasic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C653-660.
- Lofgren, M., Fagher, K., Wede, O.K., Arner, A., 2002, Decreased shortening velocity and altered myosin isoforms in guinea-pig hypertrophic intestinal smooth muscle. *J Physiol* 544, 707-714.
- Nagayama, K., Matsumoto, T., 2010, Estimation of single stress fiber stiffness in cultured aortic smooth muscle cells under relaxed and contracted states: Its relation to dynamic rearrangement of stress fibers. *J Biomech* 43, 1443-1449.
- Payne, D.N., Rogers, A.V., Adelroth, E., Bandi, V., Guntupalli, K.K., Bush, A., Jeffery, P.K., 2003, Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 78-82.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850-858.
- Siegman, M.J., Butler, T.M., Mooers, S.U., Trinkle-Mulcahy, L., Narayan, S., Adam, L., Chacko, S., Haase, H., Morano, I., 1997, Hypertrophy of colonic

- smooth muscle: contractile proteins, shortening velocity, and regulation. *Am J Physiol* 272, G1571-1580.
- Tuck, S.A., Maghni, K., Poirier, A., Babu, G.J., Periasamy, M., Bates, J.H., Leguillette, R., Lauzon, A.M., 2004, Time course of airway mechanics of the (+)insert myosin isoform knockout mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 326-332.
- Watanaveeradej, V., Simasathien, S., Nisalak, A., Endy, T.P., Jarman, R.G., Innis, B.L., Thomas, S.J., Gibbons, R.V., Hengprasert, S., Samakoses, R., Kerdpanich, A., Vaughn, D.W., Putnak, J.R., Eckels, K.H., Barrera Rde, L., Mammen, M.P., Jr., 2011, Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naive infants. *Am J Trop Med Hyg* 85, 341-351.
- White, S., Martin, A.F., Periasamy, M., 1993, Identification of a novel smooth muscle myosin heavy chain cDNA: isoform diversity in the S1 head region. *Am J Physiol* 264, C1252-1258.
- Wilson, J.W., Li, X., Pain, M.C., 1993, The lack of distensibility of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 148, 806-809.

3. Chapitre 3 : Discussion générale

3.1. Régulation

Dans cette étude, nous avons analysé la contribution des différents isoformes de la myosine du muscle lisse à l'obstruction respiratoire dans le souffle chez le cheval. Nos résultats mettent en évidence une implication plus importante de l'isoforme (+)insert par rapport à l'isoforme (-)insert dans le phénotype. Nous savons que l'épissage alternatif est le mécanisme responsable de la régulation de la transcription d'un isoforme plutôt qu'un autre (Babij, 1993; Haase and Morano, 1996). Un vide reste toutefois à combler dans la littérature quant aux éléments qui influencent ce processus. Il est possible que les facteurs de régulation induits par l'inflammation lors d'une exposition antigénique (miRNA, protéines, etc.) puissent se lier à l'ARNm de l'isoforme (-)insert et favoriser sa dégradation dans les voies respiratoires. Ces mêmes facteurs pourraient également contribuer à la production de l'isoforme (+)insert en se liant au promoteur du gène de la myosine et en induisant la transcription de cet isoforme. L'épissage alternatif est un mécanisme cellulaire très complexe qui peut lui-même être contrôlé à plusieurs niveaux. L'investigation de cette machinerie de régulation serait une étape importante à réaliser afin d'améliorer notre compréhension de la pathologie qu'est le souffle.

Une autre avenue à explorer serait la voie de signalisation impliquant le Serum Response Factor (SRF). SRF est une protéine nucléaire exprimée de façon ubiquitaire. Il possède une séquence lui permettant de se lier, entre autre, au promoteur du gène de la myosine et de promouvoir sa transcription (Owens et al., 2004). Ce facteur de transcription joue un rôle clé dans l'expression des gènes de l'appareil contractile des cellules musculaires lisses (Owens et al., 2004). Il a d'ailleurs été montré que l'obstruction mécanique de l'intestin modifiait l'interaction de SRF avec les gènes de la myosine et de l' α -actine du muscle lisse (Chen et al., 2008). Inversement, l'inhibition ciblée du gène de SRF provoque un sévère désordre de motilité intestinale, similaire à l'obstruction intestinale connue chez l'homme (Mericskay et al., 2007). Jusqu'à ce jour, il n'existe aucune donnée

dans la littérature nous permettant d'établir une relation claire entre l'isoforme (+)insert de la myosine et le facteur de transcription SRF. Toutefois, les connaissances actuelles nous indiquent qu'un stimulus inflammatoire influence à la hausse l'action de SRF (Li et al., 2013; Liu et al., 2003). Il est donc envisageable de penser que le facteur de transcription SRF agirait de manière indirecte sur l'expression de l'isoforme (+)insert de la myosine par la modulation d'autres agents induisant une régulation positive de cet isoforme (miRNA, protéines, etc.) lors de l'exposition antigénique chez le cheval atteint de souffle.

3.2. Normalisation des résultats

3.2.1. Gènes de référence

De façon générale, les résultats de quantification génique doivent être rapportées à un gène de référence, dont l'expression est constitutive, stable et constante chez tous les individus testés, indépendamment d'un traitement ou d'une maladie. Ainsi, le gène de référence permet de mesurer la variation de l'expression des gènes d'intérêt, en corrigeant les variations inter-échantillons de l'efficacité de la réaction PCR, ainsi que les erreurs de quantification des échantillons. Le gène de référence permet également de normaliser la quantité d'ADN ajouté dans chaque réaction (Bustin, 2002). Aucun des gènes évalués dans le cadre de cette étude ne remplissait les conditions de stabilité et de constance requises. En effet, après avoir testé plus d'une dizaine de gènes (entre autres GAPDH, S9, 18S, PPIA, RPL0, HPRT1, β -actine), nous avons constaté que ceux-ci étaient surrégulés dans l'arbre bronchique des chevaux atteints de souffle symptomatiques (en crise). Toute variation dans l'expression du gène de référence dissimule les vrais changements d'expression des gènes mesurés. Même en combinant plusieurs gènes, leur utilisation aurait été inappropriée. Dans la mesure où nous voulions démontrer la prépondérance d'un isoforme de la myosine par rapport à un autre, nous avons

exploré différents ratios impliquant les isoformes ((+) et (-)insert) et certains marqueurs du muscle (myosine totale et *α -smooth muscle actin*).

3.2.2. Myosine et α -actine

L'étude 1 présente les résultats d'abord sous forme de ratio dans lequel l'expression de l'isoforme (+)insert (SMB) est rapportée sur l'expression de l'isoforme (-)insert (SMA). Nous éliminons ainsi le problème de gènes de référence, tout en nous permettant de répondre à la question initiale, à savoir si un isoforme était prédominant par rapport à l'autre. Nous avons également exploré le ratio (+)insert sur la myosine totale (total SMMHC), puisqu'il nous renseigne sur la proportion de l'isoforme sur la protéine totale. Ce ratio est d'ailleurs utilisé dans quelques études (DiSanto et al., 2003; Leguillette et al., 2005; Lofgren et al., 2002). Nous avons aussi examiné la possibilité de normaliser l'expression de chacun des isoformes en la rapportant sur l' *α -smooth muscle actin* (α -actine), un marqueur de la quantité de muscle. Dans la littérature, il ne semble pas exister de consensus sur le gène qu'il serait approprié d'utiliser; l' α -actine et la myosine totale sont tous deux répertoriés (DiSanto et al., 2003; Grainger et al., 1998; Lofgren et al., 2002). Dans une étude précédente menée dans notre laboratoire, Dre Leclère a pu montrer par immunofluorescence que la myosine totale et l' α -actine étaient colocalisées dans des proportions semblables dans le muscle lisse des voies respiratoires chez le cheval atteint de souffle (Leclere et al., 2012). Une autre étude met en évidence que le profil d'expression de ces deux protéines suit un patron semblable lors de la différenciation de cellules vasculaires en artères (Grainger et al., 1998). Nous avons décidé de rapporter l'expression de l'isoforme (+)insert sur l'expression de la myosine totale (toutes les formes de myosine), puisque ce ratio est utilisé dans plusieurs autres études et que selon notre réflexion, celui-ci semble le mieux refléter la proportion de l'isoforme (+)insert dans le muscle lisse total. Toutefois, d'autres ratios sont à considérer. Dans cette optique, nous avons aussi mesuré l'expression de l' α -actine dans les 3 études, afin d'explorer ces différents ratios. Bien que nous

ayons choisi de ne pas présenter ces résultats dans la publication, ceux-ci apportent des éléments intéressants à l'étude, qui seront discutés ici.

3.3. Résultats complémentaires

3.3.1. Données brutes et autres ratios possibles

L'analyse des données brutes doit se faire avec discernement, mais en regardant les résultats de l'étude 1, nous observons que l'expression de l'isoforme (+)insert est augmentée chez les chevaux en exacerbation clinique en comparaison avec les deux autres groupes (Figure 3.1A). Nous remarquons aussi que l'expression de l'isoforme (-)insert semble similaire dans les 3 groupes (Figure 3.1B). Pour les gènes dits « de normalisation », nous voyons que l'expression brute de la myosine totale est plus faible que l'expression de l' α -actine pour les 3 groupes de chevaux étudiés (Figure 3.1C et D). Nous observons également que chacun de ces gènes a un niveau d'expression similaire entre les chevaux atteints de souffle en exacerbation et les individus sains. Finalement, pour le groupe de chevaux en rémission clinique, les gènes de l' α -actine et la myosine sont exprimés de façons différentes par rapport aux 2 autres groupes. Le retrait antigénique semble moduler à la hausse le gène de la myosine totale et à la baisse le gène de l' α -actine. Ces changements ne sont toutefois observés qu'au niveau du muscle lisse des bronches et de la trachée. L'ajout d'un groupe de chevaux contrôles au pâturage nous apporterait plus de précision sur la cause de ces changements d'expression génique, à savoir s'ils sont modulés par la pathologie ou par le retrait antigénique. Les données d'expression de l'isoforme (+)insert qu'elles soient normalisées par (-)insert, par la myosine totale ou par l' α -actine, nous renvoient le même message, soit que l'expression de cet isoforme est augmentée chez les chevaux en exacerbation clinique par rapport aux deux autres groupes.

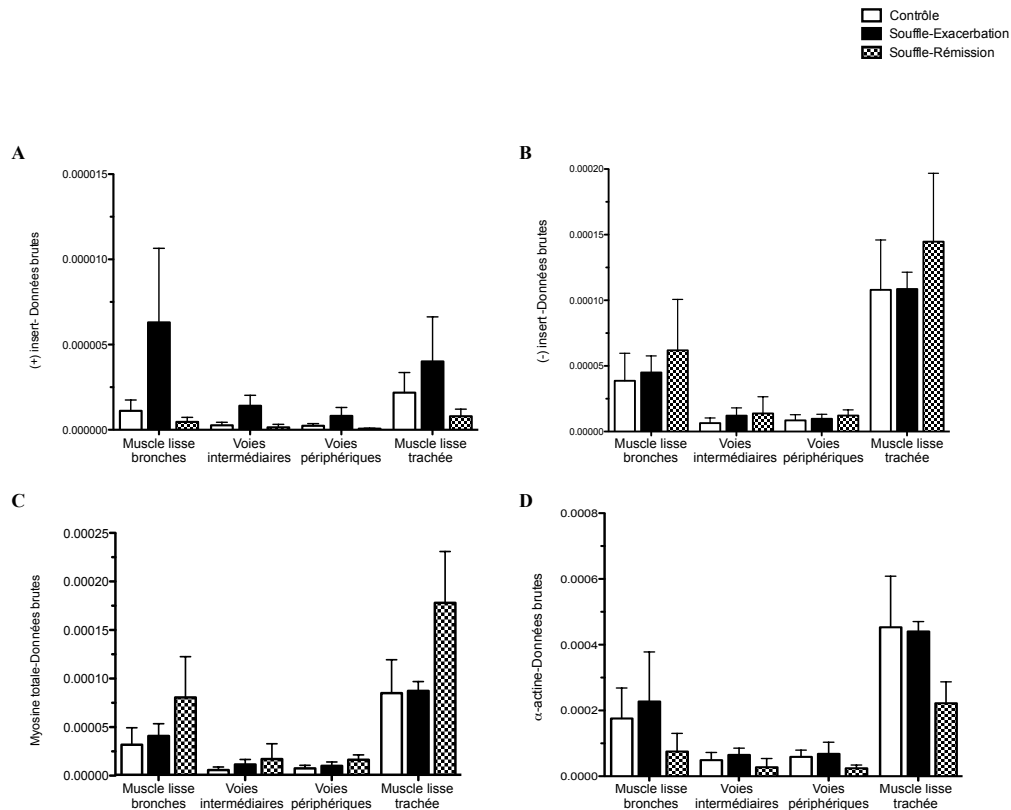


Figure 3.1. Données brutes de l'étude 1. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux contrôles (colonnes blanches; n = 8), en crise (colonnes noires; n = 6) et en rémission clinique (colonnes quadrillées; n = 3). Les données représentent la moyenne \pm SD. Duplicata reproductibles. **(A)** Expression brute de l'isoforme (+)insert; **(B)** Expression brute de l'isoforme (-)insert; **(C)** Expression brute de la myosine totale; **(D)** Expression brute de l' α -actine du muscle lisse.

L'interprétation des résultats chez les chevaux atteints du souffle en rémission est quant à elle plus difficile, en raison de la variation des gènes de normalisation. Ainsi, le niveau d'expression de l'isoforme (+)insert apparaît plus faible chez les chevaux en rémission comparé aux contrôles lorsque normalisé par la myosine totale (Article Figure 2.4) et similaire à l'expression du groupe contrôle lorsque normalisé par l' α -actine (Figure 3.2A). Quant à l'isoforme (-)insert, son niveau d'expression est différent dans le groupe de chevaux en rémission selon la normalisation utilisée. En normalisant par la myosine totale (Figure 3.2B), nous obtenons un niveau d'expression plus faible pour ce groupe comparé aux chevaux

contrôles et en crise, alors qu'il devient plus important lorsqu'il est normalisé par l' α -actine (Figure 3.2C).

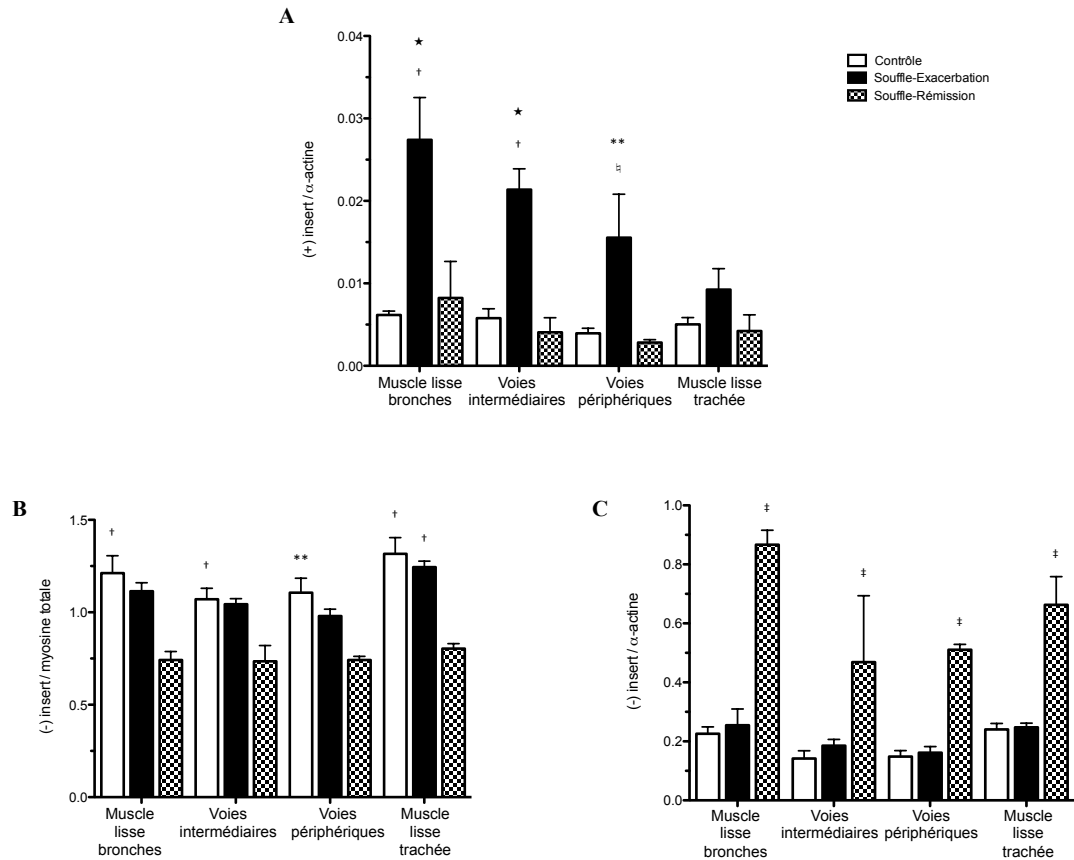


Figure 3.2. Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 1. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux contrôles (colonnes blanches; n = 8), en crise (colonnes noires; n = 6) et en rémission clinique (colonnes quadrillées; n = 3). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Duplicata reproductibles. (A) Expression de l'isoforme (+)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse; (B) Expression de l'isoforme (-)insert normalisée par la myosine totale; (C) Expression de l'isoforme (-)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse. ★: Différent des chevaux contrôles; †: Différent des chevaux en rémission; ‡: Différent des chevaux contrôles et souffle; †‡: Différent des chevaux contrôles, mais pas significatif après ajustement. **: Différent des chevaux en rémission, mais pas significatif après ajustement.

En gardant à l'esprit que les données brutes de l'expression de l'isoforme (-)insert étaient similaires pour chaque groupe, nous concluons que les différences

d'expression observées pour ce groupe sont engendrées par la variation des gènes de normalisation. La contribution de cet isoforme au phénotype est donc fortement mise en doute.

Pour l'étude 2, les deux traitements (fluticasone et retrait antigénique) semblent affecter de façon similaire les niveaux d'expression des deux isoformes. Nous constatons que l'expression des isoformes (+)insert et (-)insert est diminuée par les traitements et ce même lorsque le groupe recevant la fluticasone est gardé à l'écurie durant 6 mois (Figure 3.3A et B). De la même manière, on observe une diminution des deux gènes normalisateurs (Figure 3.3C et D). L'administration de corticostéroïdes et la mise au pâturage sont deux traitements fréquemment utilisés pour traiter le souffle et dont l'objectif est de diminuer l'inflammation associée à l'exposition antigénique. Ainsi, la diminution de l'expression du gène de l'alpha-actine semble concorder avec l'hypothèse qu'il pourrait être stimulé par l'inflammation. Toutefois, la diminution de l'expression du gène de la myosine totale n'était pas attendue. Ces résultats pourraient refléter la variation de la quantité de muscle lisse au sein des biopsies prélevées. Une étude suggère d'ailleurs que la corticothérapie entraînerait une réduction de la surface occupée par le muscle lisse dans des biopsies bronchiques (Kelly et al., 2010).

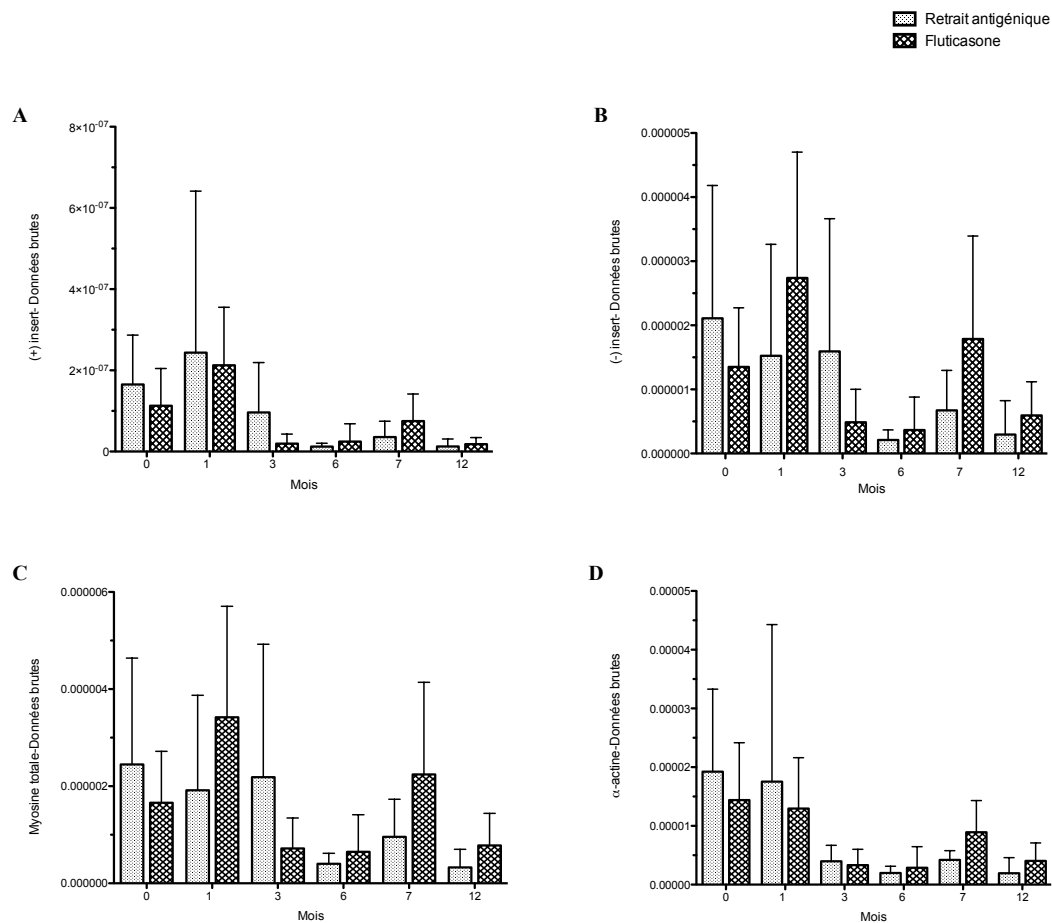


Figure 3.3. Données brutes de l'étude 2. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux atteints de souffle mis au pâturage (gris pâle; n = 5) et recevant des corticostéroïdes en inhalation (gris foncé; n = 6). Les données représentent la moyenne \pm SD. Duplicata reproductibles. (A) Expression brute de l'isoforme (+)insert; (B) Expression brute de l'isoforme (-)insert; (C) Expression brute de la myosine totale; (D) Expression brute de l' α -actine du muscle lisse.

Pour l'expression de l'isoforme (+)insert, nous retenons encore une fois le même message général quelque soit la méthode de normalisation utilisée; l'expression de cet isoforme tend à diminuer avec les traitements au fil du temps (Figure 3.4A et B). Toutefois, nous constatons que les traitements mènent à une diminution non-significative de l'expression de l'isoforme (+)insert lorsque les données sont rapportées sur (-)insert, alors qu'elles avaient atteint le niveau de significativité avec le ratio (+)insert/total SMMHC. Deux explications sont

possibles quant à la différence entre ces résultats. D'abord, comme nous n'observons pas de différence entre les ratios (+)insert/(-)insert et (+)insert/total SMMHC pour le matériel d'autopsie de l'étude 1, nous croyons qu'il y aurait pu y avoir un problème lors de la prise des biopsies (mauvaise qualité de biopsies, problème de conservation, contamination, dégradation des échantillons, etc.). La deuxième source d'erreur possible pourrait être liée au gène normalisateur lui-même. Il est important de mentionner que nous soupçonnons que les amorces pour la réaction PCR de la myosine totale pourraient aussi amplifier le gène de la myosine 9, qui elle est retrouvée dans le tissu vasculaire. De ce fait, nous devons considérer que ce gène puisse influencer les résultats des expressions rapportées sur la myosine totale. Toutefois, considérant qu'il ne semble pas y avoir de conséquences pour les ratios de l'étude 1 (et de l'étude 3), cette hypothèse semble peu probable, mais des expérimentations supplémentaires seront nécessaires afin de vérifier l'influence du gène de la myosine 9 vasculaire sur l'ensemble des résultats. Pour l'isoforme (-)insert, nous observons une certaine fluctuation de son expression peu importe la normalisation (Figure 3.4C et D). Ceci pourrait être associé à l'alternance des saisons et les changements de température qui, en agissant sur le cycle circadien, pourrait influencer l'expression de cet isoforme, tel que vu pour plusieurs gènes (Okamura, 2004). Cependant, nous ne remarquons pas de différence d'expression de cet isoforme entre les deux groupes pour toute la durée de l'étude. Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'isoforme sans insert ne serait pas impliqué de façon aussi marquée que l'isoforme avec insert dans l'obstruction des voies respiratoires.

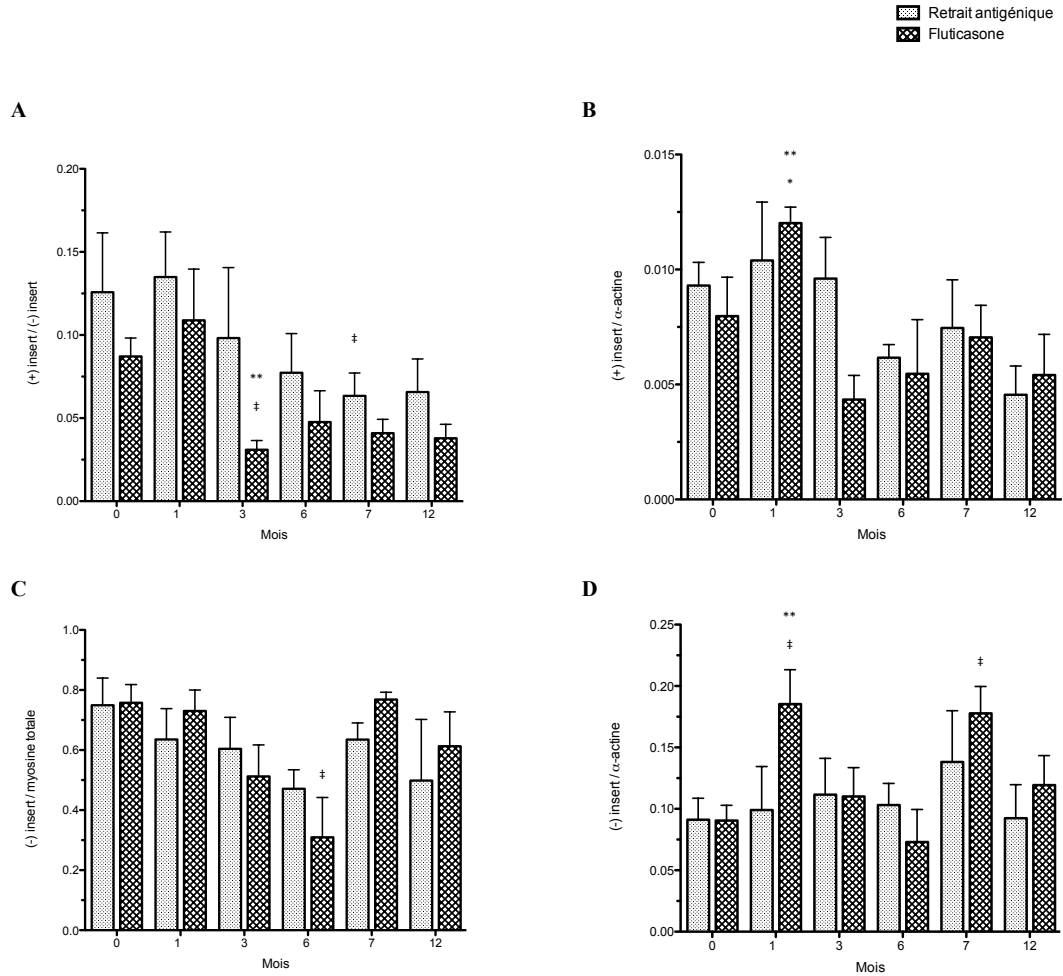


Figure 3.4. Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 2. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux atteints de souffle mis au pâturage (gris pâle; n = 5) et recevant des corticostéroïdes en inhalation (gris foncé; n = 6). Les données représentent la moyenne \pm SEM. Duplicata reproductibles. (A) Expression de (+)insert sur l'expression de l'isoforme (-)insert; (B) Expression de (+)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse; (C) Expression de (-)insert normalisée par la myosine totale; (D) Expression de (-)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse. *: Différent du temps 0 dans le même groupe. ‡: Différent du temps 0 dans le même groupe, mais pas significatif après ajustement. **: Différent du groupe au pâturage au même temps, mais pas significatif après ajustement.

Pour l'étude 3, nous observons que l'expression brute des deux isoformes tend à diminuer suite à l'exposition antigénique. (Figure 3.5A et B). Chez les chevaux atteints de souffle, l'expression de l'isoforme (+)insert semble stable du 1^{er}

au 30^e jours d'exposition antigénique, alors que celle de l'isoforme (-)insert continue de diminuer. Nous constatons également une diminution de l'expression brute de la myosine totale (Figure 3.5C) et de l' α -actine (Figure 3.5D) pour les deux groupes. Nous nous attendions plutôt à une expression croissante de l' α -actine à 30 jours, étant donnée l'inflammation et le bronchospasme entraînés par l'exposition antigénique. La diminution de toutes les données brutes est pour le moins inattendue.

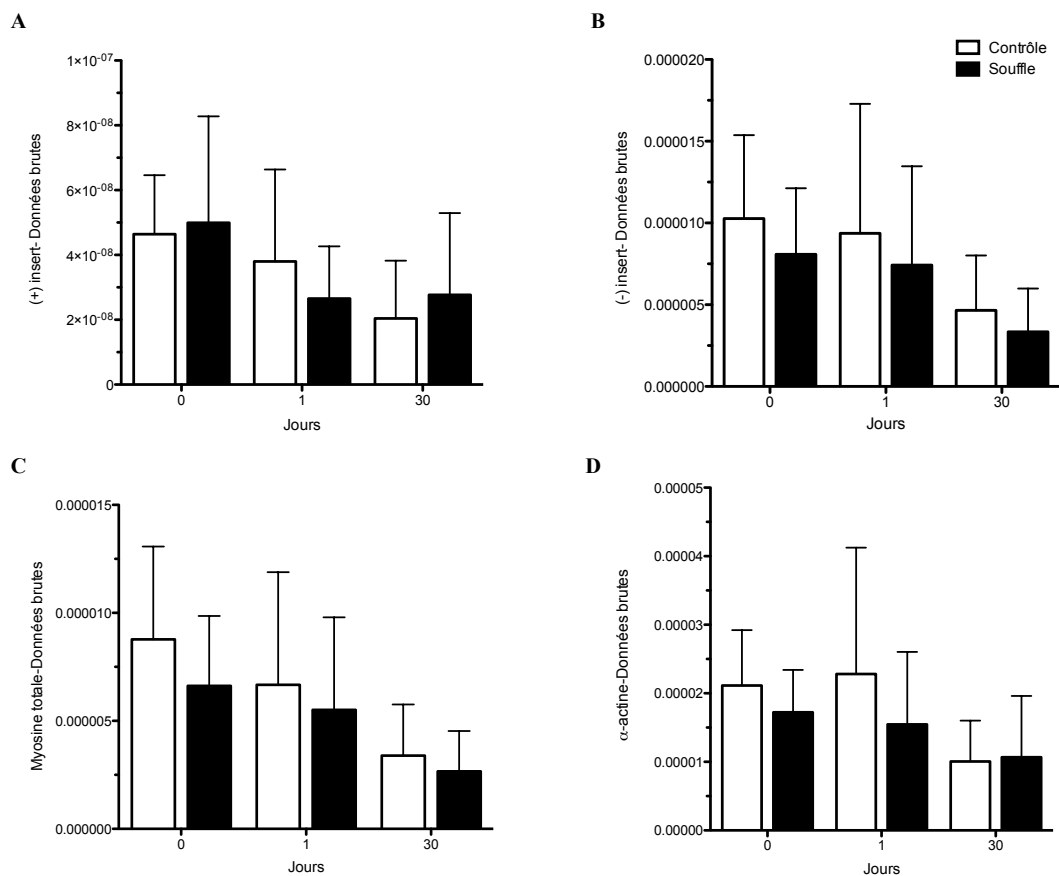


Figure 3.5. Données brutes de l'étude 3. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux contrôles (colonnes blanches; n = 5) et atteints de souffle (colonnes noires; n = 6) lors de leur réexposition aux allergènes après une période de rémission de 3 mois. Les données représentent la moyenne \pm SD. Duplicata reproductibles. (A) Expression brute de l'isoforme (+)insert; (B) Expression brute de l'isoforme (-)insert; (C) Expression brute de la myosine totale; (D) Expression brute de l' α -actine du muscle lisse.

Ces résultats sont toutefois concordants avec une étude précédente du Dre Leclère effectuée sur les mêmes chevaux, qui montre une diminution de la quantité de muscle dans les biopsies endobronchiques lorsque ceux-ci sont exposés aux antigènes durant 1 mois (Leclere et al., 2011a). Ainsi, il serait logique de retrouver une expression plus faible d'ARNm de ces gènes. Concernant les autres ratios, les résultats du ratio (+)insert/(-)insert sont très similaires à celui où nous normalisons par la myosine totale (Figure 3.6A). Ceci vient mettre un doute supplémentaire quant à l'influence de la myosine 9 sur nos résultats. De même, lorsque normalisé par l' α -actine, le patron d'expression de l'isoforme (+)insert est semblable à celui rapporté sur la myosine totale et aucun résultat n'est significatif (Figure 3.6B). Pour l'isoforme (-)insert chez les chevaux atteints de souffle, son expression demeure stable à tous les temps (Figure 3.6C). Le groupe contrôle quant à lui démontre aussi une expression assez stable de cet isoforme. Lorsque nous normalisons les données par l' α -actine (Figure 3.6D), les deux groupes démontrent une expression similaire de l'isoforme (-)insert pour le temps 0 et 24 h, alors qu'après 30 jours d'exposition antigénique, nous constatons une légère baisse de l'expression chez les chevaux atteints de souffle. Peu importe la normalisation, aucune des données de l'étude 3 n'atteint la significativité. Cela nous indique qu'il n'y a probablement pas d'effet à observer ou que la puissance statistique de l'étude n'est pas suffisante à l'obtention de résultats significatifs.

Les différents ratios d'expression présentés dans cette étude montrent qu'il faut être très prudent avec la normalisation, car les résultats et leur interprétation peuvent varier en fonction du choix du ratio et de la manière dont les résultats sont présentés.

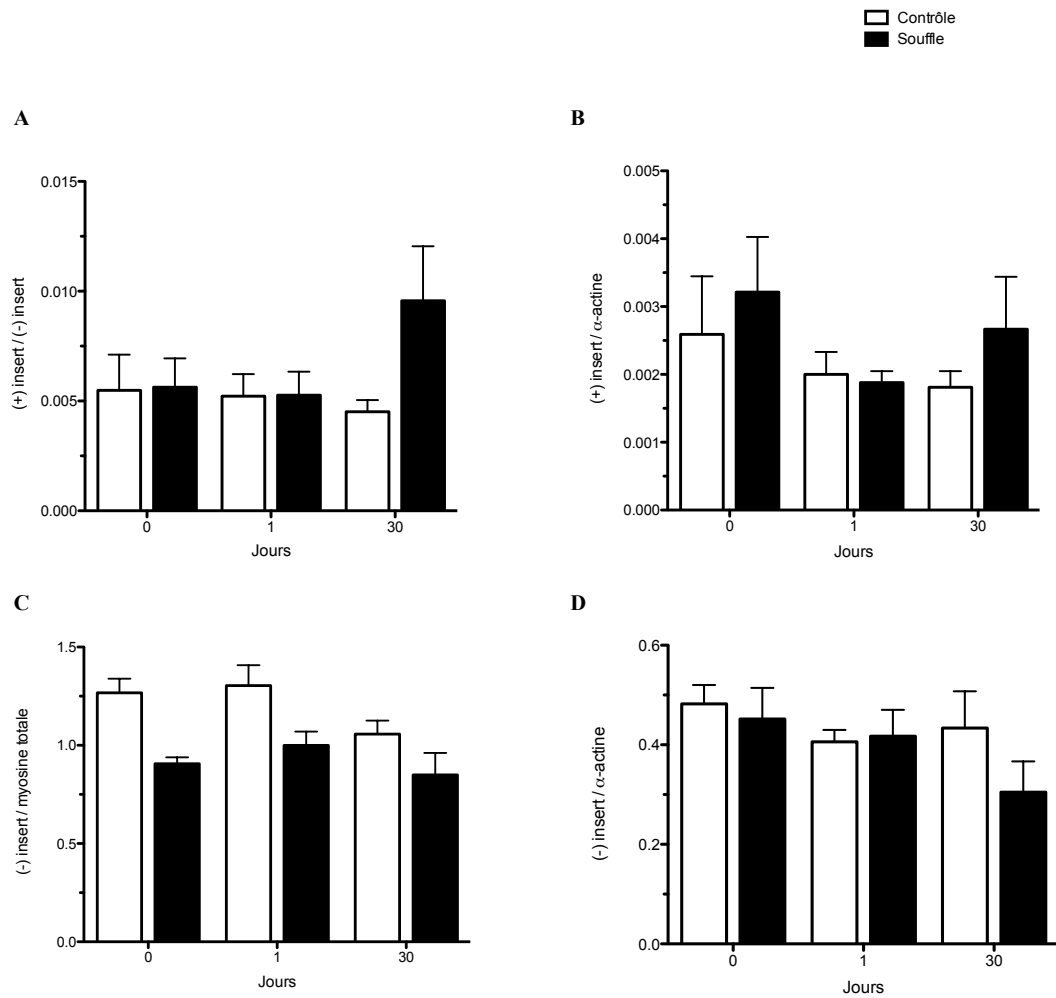


Figure 3.6. Ratios d'expression des isoformes (+)insert et (-)insert pour l'étude 3. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux contrôles (colonnes blanches; n = 5) et atteints de souffle (colonnes noires; n = 6) lors de leur réexposition aux allergènes après une période de rémission de 3 mois. Les données représentent la moyenne \pm SEM. Duplicata reproductibles. **(A)** Expression de (+)insert sur l'expression de l'isoforme (-)insert; **(B)** Expression de (+)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse; **(C)** Expression de (-)insert normalisée par la myosine totale; **(D)** Expression de (-)insert normalisée par l' α -actine du muscle lisse.

3.3.2. TGF- β 1

Nous avons également tenté de vérifier le niveau d'expression du facteur de croissance transformant- β 1 (TGF- β 1) par qPCR dans les études 1 et 2. Cette cytokine est impliquée dans la formation de fibrose sous-épithéliale et son

expression est augmentée chez les patients asthmatiques, particulièrement chez les personnes atteintes sévèrement (Minshall et al., 1997). De plus, le TGF- β 1 stimulerait la production d' α -actine par les cellules musculaires lisses en situation inflammatoire et serait relié au remodelage des voies respiratoires (Grainge et al., 2011; Woodman et al., 2008). Nous nous attendions ainsi à avoir un patron d'expression pour le TGF- β 1 semblable à celui obtenu pour l' α -actine, ce qui n'est pas le cas pour l'étude 1 (Figure 3.7). Nous obtenons en général une expression de TGF- β 1 plus élevée chez les chevaux en crise comparés aux contrôles et aux chevaux en rémission, alors que les niveaux d'expression de l' α -actine étaient similaires chez les contrôles et les chevaux en crise et plus faible chez les chevaux en rémission. Toutefois, les données brutes de l'étude 2 font état d'une certaine diminution de l'expression génique de la cytokine avec les deux traitements, comme pour celui de l' α -actine (Figure 3.8). Il est difficile d'émettre une hypothèse avec des résultats discordants. De plus, les données ne sont pas totalement fiables, puisque le qPCR ne permet pas de différencier la forme active du TGF- β 1, qui est le résultat de la dissociation de cette molécule d'un complexe protéique répresseur (Shi et al., 2011). Pour cette raison, nous avons choisi de mettre un terme aux expérimentations suite à l'étude 2. Afin de quantifier de manière plus précise l'expression de ce facteur, il faudrait mettre sur pied un essai d'immunobuvardage de type western (westernblot) ou immunohistochimie qui permettrait de cibler le TGF- β 1 lorsque celui-ci est lié à son complexe répresseur (inactif) et libre (actif).

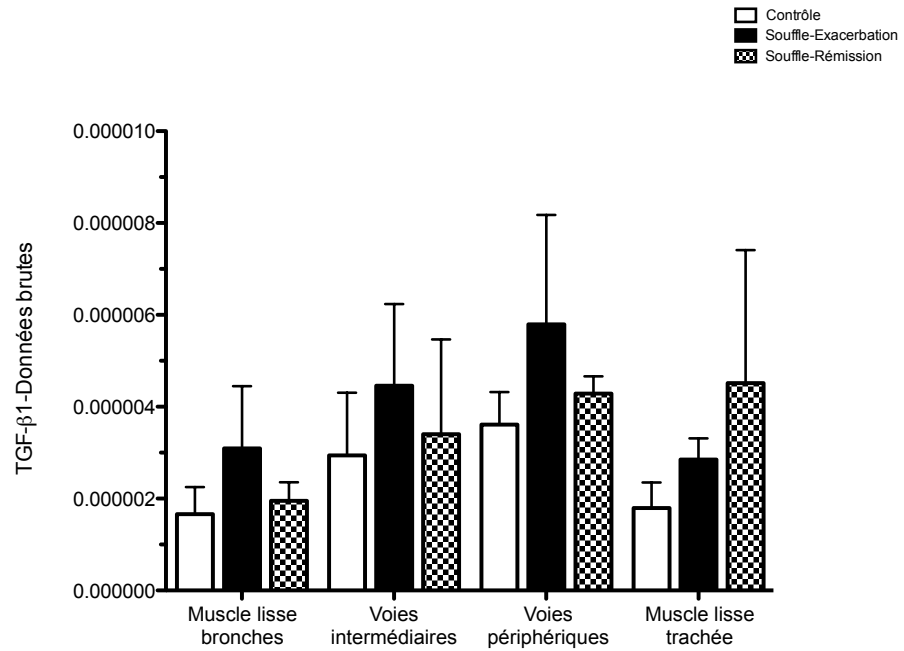


Figure 3.7. Données brutes de l'expression de TGF-β1 pour l'étude 1. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux contrôles (colonnes blanches; n = 8), en crise (colonnes noires; n = 6) et en rémission clinique (colonnes quadrillées; n = 3). Les données représentent la moyenne ± SD. Duplicata reproductibles.

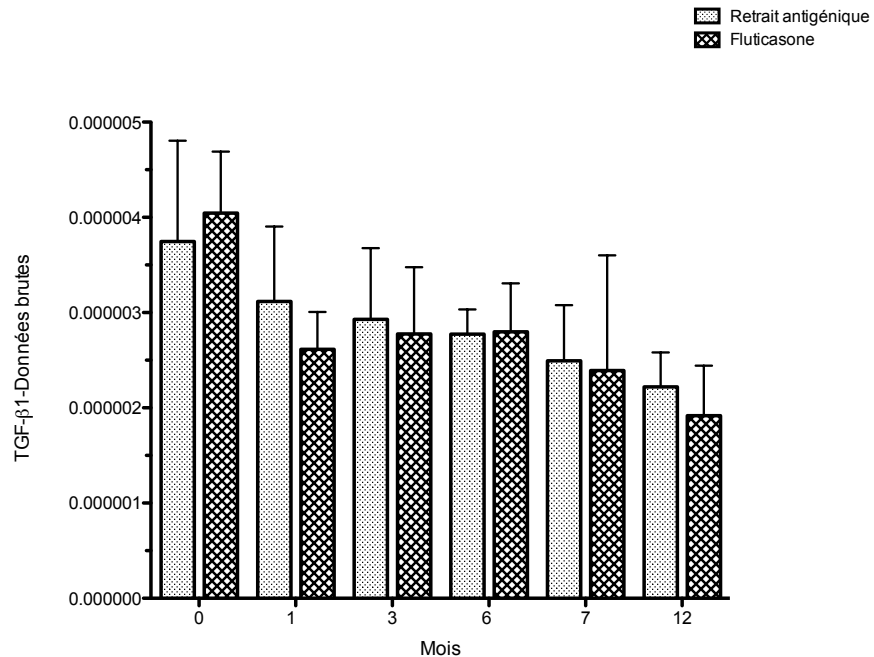


Figure 3.8. Données brutes de l'expression de TGF-β1 pour l'étude 2. Évaluation de l'expression génique par qPCR chez les chevaux atteints de souffle mis au pâturage (gris pâle; n = 5) et recevant des corticostéroïdes en inhalation (gris foncé; n = 6). Les données représentent la moyenne ± SD. Duplicata reproductibles.

3.4. Analyse protéique

Initialement, la détection protéique devait être réalisée avec la technique d'immunobuvardage de type western. L'anticorps primaire utilisé lors de ces expériences nous a été généreusement fourni par le laboratoire du Dre Lauzon (Université McGill). Celui-ci était dirigé contre l'insert de la protéine humaine dont la séquence immunogène est la suivante : DSITQGPSFAYGELEK (séquence équine : DSITQGPPLAYGELEK). L'anticorps provenait de sérums non purifiés de deux lapins immunisés et dont la réactivité immunogène avait été démontrée sur des tissus humains (Leguillette et al., 2005). La similitude de la séquence immunogène équine avec la séquence humaine permettait a priori l'utilisation de cet anticorps sur nos échantillons équins. Après optimisation, nous avons pu obtenir un signal pour

tous les échantillons, quoi que faible pour beaucoup d'entre eux. De plus, un manque de spécificité persistait et maintes bandes apparaissaient lors de la révélation. Suite à plusieurs essais de quantification protéique par cette technique, nous avons constaté que les résultats étaient discordants, voir contradictoires non seulement avec nos résultats d'expression génique, mais également avec la fonction biologique supposée de la protéine. De même, il existait un manque de constance dans les résultats. Suite à une réflexion approfondie, nous nous sommes tournés vers une technologie de pointe afin d'effectuer la quantification protéique. Nous avons ainsi choisi la spectrométrie de masse, plus précisément par des essais de Multiple Reaction Monitoring (MRM), de par la fiabilité et la précision des résultats que cette technique génère. Nous nous sommes restreints à l'analyse des échantillons protéiques du muscle lisse des bronches (étude 1), en raison de la grande significativité des résultats obtenus pour l'expression génique dans ce tissu, et pour limiter les coûts engendrés par la manipulation. De plus, l'analyse de tous les échantillons protéiques n'aurait pu se faire dans un délai jugé raisonnable. Finalement, en vue de la bonne corrélation entre l'analyse génique et protéique dans les bronches, nous concluons que la quantification de l'ARNm de l'isoforme (+)insert est une mesure représentative de l'expression protéique dans l'arbre respiratoire du cheval atteint de souffle.

4. Chapitre 4 : Conclusion & perspectives

Cette thèse nous a permis d'incorporer dans la littérature scientifique de nouvelles données concernant la modulation et la réversibilité de l'expression de l'isoforme (+)insert de la chaîne lourde de la myosine (SMMHC). Nous avons pu déterminer pour la première fois la localisation anatomique de l'isoforme (+)insert dans l'arbre bronchique. Nous avons montré que cet isoforme serait synthétisé chez les individus asthmatiques en réponse à une exposition antigénique prolongée, et que cette réponse était réversible. Notre modèle équin permet des études prospectives et séquentielles sur les mêmes animaux, un point limitant chez l'humain et impossible chez les rongeurs. Notre laboratoire a démontré à plusieurs reprises la pertinence du modèle équin atteint de souffle pour les études sur l'asthme humain. En vue de ces nombreuses études dont les aboutissements ont contribué à l'avancement des connaissances chez l'homme, nous croyons que les résultats de ce projet pourraient être extrapolés à l'asthme chez l'humain. Nos données suggèrent fortement que l'isoforme (+)insert fait partie intégrante d'un mécanisme de défense complémentaire enclenché suite à une exposition antigénique prolongée. Cet isoforme a possiblement un rôle à jouer dans le bronchospasme étant donné les propriétés mécanistiques qui lui sont attribuées. Toutefois, la corrélation entre la présence de cet isoforme et les propriétés mécanistiques des voies respiratoires des chevaux atteints de souffle reste encore à démontrer. En ce qui concerne l'isoforme (-)insert, les résultats de notre étude ne nous permettent pas de conclure que celui-ci est impliqué de façon importante dans la pathologie du souffle chez le cheval.

Prospectivement, nous sommes intéressés à réaliser des études fonctionnelles afin de compléter les résultats obtenus au cours de ce projet. Nous savons déjà que chez l'humain, la présence de l'isoforme (+)insert est associée avec une activité ATPasique deux fois plus élevée ainsi qu'un taux de propulsion du filament d'actine plus important qu'avec l'isoforme (-)insert (Gil and Lauzon, 2007; Kelley et al., 1993; Rovner et al., 1997). Il serait donc pertinent de vérifier si l'isoforme équin

possède les mêmes propriétés. Cela ajouterait du poids à l'hypothèse de son implication dans le bronchospasme chez les chevaux atteints de souffle. Ce genre d'expérimentation pourra être réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dre Lauzon par la technique de « laser trap » et par des tests de motilité *in vitro* (Lauzon et al., 1998a; Lauzon et al., 1998b; Leguillette et al., 2008).

Nous planifions également d'entreprendre des études concernant l'implication possible de certains microARN (miRNA) au phénotype asthmatique. Depuis quelques années, ce champs d'étude s'est considérablement développé et de plus en plus d'évidences sont révélées quant au rôle des miRNA dans les processus inflammatoires du système respiratoire et de remodelage du muscle lisse vasculaire en lien avec l'asthme (Foster et al., 2013; Rebane and Akdis, 2013). Nous aimerions ainsi dresser un patron d'expression de certains de ces miRNA soupçonnés d'être impliqués dans la maladie, chez les chevaux atteints de souffle, afin de mieux comprendre les facteurs de régulation impliqués dans l'asthme.

Nous suggérons enfin, chez les chevaux atteints de souffle, la présence d'une mutation dans l'une des régions codantes de la protéine, qui réduirait les capacités fonctionnelles de celle-ci en cas de forte demande. La production de l'isoforme (+)insert pourrait ainsi être favorisée, afin de compenser les lacunes contractiles du muscle lisse. Dans le but de valider notre hypothèse, nous prévoyons faire séquencer l'ARNm entier de la chaîne lourde de la myosine dans des tissus de chevaux atteints de souffle et de chevaux contrôles.

Les études futures devront se pencher sur les mécanismes et voies de signalisation régulant l'expression de l'isoforme (+)insert suite à l'exposition antigénique, afin de mieux comprendre son rôle dans le bronchospasme. Cette protéine pourrait ainsi être une nouvelle cible thérapeutique intéressante. La prévention de sa surexpression dès l'apparition des signes cliniques pourrait contribuer à diminuer la force de la constriction des voies respiratoires et réduire l'intensité des crises. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques reste essentielle en vue d'un traitement de la maladie elle-même et non seulement des conséquences qui en découlent.

Bibliographie

- Adelstein, R.S., Eisenberg, E., 1980, Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu Rev Biochem* 49, 921-956.
- Babij, P., 1993, Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing of a visceral isoform of smooth muscle myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res* 21, 1467-1471.
- Babu, G.J., Loukianov, E., Loukianova, T., Pyne, G.J., Huke, S., Osol, G., Low, R.B., Paul, R.J., Periasamy, M., 2001, Loss of SM-B myosin affects muscle shortening velocity and maximal force development. *Nat Cell Biol* 3, 1025-1029.
- Barbato, A., Turato, G., Baraldo, S., Bazzan, E., Calabrese, F., Panizzolo, C., Zanin, M.E., Zuin, R., Maestrelli, P., Fabbri, L.M., et al. 2006. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174:975-981.
- Barnes, P.J., 2008, The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 118, 3546-3556.
- Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., and Hardin, J. 2006. *The world of the cell*. San Francisco, CA.
- Bel, E.H., Zwinderman, A.H., Timmers, M.C., Dijkman, J.H., Sterk, P.J., 1991, The protective effect of a beta 2 agonist against excessive airway narrowing in response to bronchoconstrictor stimuli in asthma and chronic obstructive lung disease. *Thorax* 46, 9-14.
- Bice, D.E., Seagrave, J., Green, F.H., 2000, Animal models of asthma: potential usefulness for studying health effects of inhaled particles. *Inhal Toxicol* 12, 829-862.
- Bullimore, S.R., Siddiqui, S., Donovan, G.M., Martin, J.G., Sneyd, J., Bates, J.H., Lauzon, A.M., 2011, Could an increase in airway smooth muscle shortening velocity cause airway hyperresponsiveness? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L121-131.
- Bustin, S.A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39.
- Calovini, T., Haase, H., and Morano, I. 1995. Steroid-hormone regulation of myosin subunit expression in smooth and cardiac muscle. *J Cell Biochem* 59:69-78.
- Chen, J., Chen, H., Sanders, K.M., Perrino, B.A., 2008, Regulation of SRF/CARF-dependent gene transcription during chronic partial obstruction of murine small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 20, 829-842.
- Chung, K.F., 2008, *Airway smooth muscle in asthma and COPD: biology and pharmacology*. Wiley, Hoboken, N.J., 312 p.
- Decarreau, J.A., Chrin, L.R., Berger, C.L., 2011, Loop 1 dynamics in smooth muscle myosin: isoform specific differences modulate ADP release. *J Muscle Res Cell Motil* 32, 49-61.

- Derksen, F.J., Olszewski, M., Robinson, N.E., Berney, C., Lloyd, J.W., Hakala, J., Matson, C., Ruth, D., 1996, Use of a hand-held, metered-dose aerosol delivery device to administer pirbuterol acetate to horses with 'heaves'. *Equine Vet J* 28, 306-310.
- DiSanto, M.E., Stein, R., Chang, S., Hypolite, J.A., Zheng, Y., Zderic, S., Wein, A.J., Chacko, S., 2003, Alteration in expression of myosin isoforms in detrusor smooth muscle following bladder outlet obstruction. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1397-1410.
- Durrani, S.R., Viswanathan, R.K., and Busse, W.W. 2011. What effect does asthma treatment have on airway remodeling? Current perspectives. *J Allergy Clin Immunol* 128:439-448; quiz 449-450.
- Ebina, M., Yaegashi, H., Chiba, R., Takahashi, T., Motomiya, M., and Tanemura, M. 1990. Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles. A morphometric study. *Am Rev Respir Dis* 141:1327-1332.
- Foster, P.S., Plank, M., Collison, A., Tay, H.L., Kaiko, G.E., Li, J., Johnston, S.L., Hansbro, P.M., Kumar, R.K., Yang, M., Mattes, J., 2013, The emerging role of microRNAs in regulating immune and inflammatory responses in the lung. *Immunol Rev* 253, 198-215.
- Gerthoffer, W.T., 1991, Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am J Physiol* 261, L15-28.
- Gil, F.R., Lauzon, A.M., 2007, Smooth muscle molecular mechanics in airway hyperresponsiveness and asthma. *Can J Physiol Pharmacol* 85, 133-140.
- Grainge, C.L., Lau, L.C., Ward, J.A., Dulay, V., Lahiff, G., Wilson, S., Holgate, S., Davies, D.E., Howarth, P.H., 2011, Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma. *N Engl J Med* 364, 2006-2015.
- Grainger, D.J., Metcalfe, J.C., Grace, A.A., Mosedale, D.E., 1998, Transforming growth factor-beta dynamically regulates vascular smooth muscle differentiation in vivo. *J Cell Sci* 111 (Pt 19), 2977-2988.
- Gunst, S.J., Tang, D.D., 2000, The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J* 15, 600-616.
- Haase, H., Morano, I., 1996, Alternative splicing of smooth muscle myosin heavy chains and its functional consequences. *J Cell Biochem* 60, 521-528.
- Hamid, Q., Shannon, J., and Martin, J.G. 2005. *Physiological Basis of Respiratory Disease*. Shelton, CT: pmph usa.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M., and Shevchenko, A. 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 75:1300-1306.
- Herszberg, B., Ramos-Barbon, D., Tamaoka, M., Martin, J.G., and Lavoie, J.P. 2006. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 118:382-388.
- Hotchkiss, J.W., Reid, S.W., Christley, R.M., 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, 301-308.

- Isidoro-Garcia, M., Davila, I., Laffond, E., Moreno, E., Lorente, F., Gonzalez-Sarmiento, R., 2005, Interleukin-4 (IL4) and Interleukin-4 receptor (IL4RA) polymorphisms in asthma: a case control study. *Clin Mol Allergy* 3, 15.
- Jackson, C.A., Berney, C., Jefcoat, A.M., Robinson, N.E., 2000, Environment and prednisone interactions in the treatment of recurrent airway obstruction (heaves). *Equine Vet J* 32, 432-438.
- Jean, D., Vrins, A., Beauchamp, G., Lavoie, J.P., 2011, Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 72, 838-842.
- Jean, D., Vrins, A., Lavoie, J.P., 1999, Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* 60, 1341-1346.
- Johns, D.P., Wilson, J., Harding, R., and Walters, E.H. 2000. Airway distensibility in healthy and asthmatic subjects: effect of lung volume history. *J Appl Physiol* 88:1413-1420.
- Jost, U., Klukowska-Rotzler, J., Dolf, G., Swinburne, J.E., Ramseyer, A., Bugno, M., Burger, D., Blott, S., Gerber, V., 2007, A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway obstruction in horses. *Equine Vet J* 39, 236-241.
- Kelley, C.A., Takahashi, M., Yu, J.H., Adelstein, R.S., 1993, An insert of seven amino acids confers functional differences between smooth muscle myosins from the intestines and vasculature. *J Biol Chem* 268, 12848-12854.
- Kelly, M.M., O'Connor, T.M., Leigh, R., Otis, J., Gwozd, C., Gauvreau, G.M., Gauldie, J., O'Byrne, P.M., 2010, Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 349-356 e313.
- King, M.W. themedicalbiochemistrypage.org.
- Lauzon, A.M., Trybus, K.M., Warshaw, D.M., 1998a, Molecular mechanics of two smooth muscle heavy meromyosin constructs that differ by an insert in the motor domain. *Acta Physiol Scand* 164, 357-361.
- Lauzon, A.M., Tyska, M.J., Rovner, A.S., Freyzon, Y., Warshaw, D.M., Trybus, K.M., 1998b, A 7-amino-acid insert in the heavy chain nucleotide binding loop alters the kinetics of smooth muscle myosin in the laser trap. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 825-837.
- Lavoie, J.P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G., Hamid, Q.A., 2001, Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *American journal of respiratory and critical care medicine* 164, 1410-1413.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Gelin-Lymburner, E., David, F., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2011a, Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 181-187.
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Joubert, P., Relave, F., Setlakwe, E.L., Beauchamp, G., Couture, C., Martin, J.G., Lavoie, J.P., 2012, Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 47, 589-596.

- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P., 2011b, Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16, 1027-1046.
- Leguillette, R., Gil, F.R., Zitouni, N., Lajoie-Kadoch, S., Sobieszek, A., Lauzon, A.M., 2005, (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B) isoform expression in human tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1277-1285.
- Leguillette, R., Lauzon, A.M., 2006, (+)Insert smooth muscle myosin heavy chain (SM-B): from single molecule to human. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1862-1874.
- Leguillette, R., Laviolette, M., Bergeron, C., Zitouni, N., Kogut, P., Solway, J., Kachmar, L., Hamid, Q., Lauzon, A.M., 2009, Myosin, transgelin, and myosin light chain kinase: expression and function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 194-204.
- Leguillette, R., Zitouni, N.B., Govindaraju, K., Fong, L.M., Lauzon, A.M., 2008, Affinity for MgADP and force of unbinding from actin of myosin purified from tonic and phasic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C653-660.
- Li, D.B., Yang, G.J., Xu, H.W., Fu, Z.X., Wang, S.W., Hu, S.J., 2013, Regulation on RhoA in Vascular Smooth Muscle Cells Under Inflammatory Stimulation Proposes a Novel Mechanism Mediating the Multiple-Beneficial Action of Acetylsalicylic Acid. *Inflammation* (In press).
- Liu, H.W., Halayko, A.J., Fernandes, D.J., Harmon, G.S., McCauley, J.A., Kocieniewski, P., McConville, J., Fu, Y., Forsythe, S.M., Kogut, P., Bellam, S., Dowell, M., Churchill, J., Lesso, H., Kassiri, K., Mitchell, R.W., Hershenson, M.B., Camoretti-Mercado, B., Solway, J., 2003, The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 39-47.
- Lofgren, M., Fagher, K., Wede, O.K., Arner, A., 2002, Decreased shortening velocity and altered myosin isoforms in guinea-pig hypertrophic intestinal smooth muscle. *J Physiol* 544, 707-714.
- Low, R.B., White, S.L., 1998, Lung smooth muscle differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 869-883.
- Ma, X., Cheng, Z., Kong, H., Wang, Y., Unruh, H., Stephens, N.L., Laviolette, M., 2002, Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L1181-1189.
- Macedo, P., Hew, M., Torrego, A., Jouneau, S., Oates, T., Durham, A., Chung, K.F., 2009, Inflammatory biomarkers in airways of patients with severe asthma compared with non-severe asthma. *Clin Exp Allergy* 39, 1668-1676.
- Marti, E., Gerber, H., Essich, G., Oulehla, J., Lazary, S., 1991, The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* 23, 457-460.
- Mericskay, M., Blanc, J., Tritsch, E., Moriez, R., Aubert, P., Neunlist, M., Feil, R., Li, Z., 2007, Inducible mouse model of chronic intestinal pseudo-obstruction by smooth muscle-specific inactivation of the SRF gene. *Gastroenterology* 133, 1960-1970.

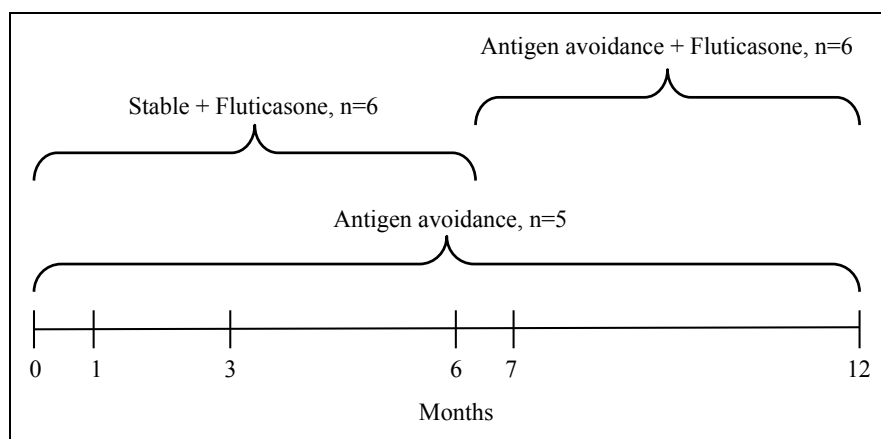
- Minshall, E.M., Leung, D.Y., Martin, R.J., Song, Y.L., Cameron, L., Ernst, P., Hamid, Q., 1997, Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 326-333.
- Mitchell, R.W., Ruhlmann, E., Magnussen, H., Leff, A.R., Rabe, K.F., 1994, Passive sensitization of human bronchi augments smooth muscle shortening velocity and capacity. *Am J Physiol* 267, L218-222.
- Monteseirin, J., 2009, Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19, 340-354.
- Morgan, K.G., Gangopadhyay, S.S., 2001, Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J Appl Physiol* 91, 953-962.
- Nagayama, K., and Matsumoto, T. 2010. Estimation of single stress fiber stiffness in cultured aortic smooth muscle cells under relaxed and contracted states: Its relation to dynamic rearrangement of stress fibers. *J Biomech* 43:1443-1449.
- North, A.J., Gimona, M., Lando, Z., Small, J.V., 1994, Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 3), 445-455.
- Okamura, H., 2004, Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. *J Biol Rhythms* 19, 388-399.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004, Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84, 767-801.
- Payne, D.N., Rogers, A.V., Adelroth, E., Bandi, V., Guntupalli, K.K., Bush, A., and Jeffery, P.K. 2003. Early thickening of the reticular basement membrane in children with difficult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 167:78-82.
- Pinto, L.A., Stein, R.T., Kabesch, M., 2008, Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr (Rio J)* 84, S68-75.
- Rebane, A., Akdis, C.A., 2013, MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 132, 15-26.
- Repka, M.X., Uozato, H., Guyton, D.L., 1986, Depth distortion during slitlamp biomicroscopy of the fundus. *Ophthalmology* 93, 47-51.
- Rhee, A.Y., Brozovich, F.V., 2000, The smooth muscle cross-bridge cycle studied using sinusoidal length perturbations. *Biophys J* 79, 1511-1523.
- Robinson, N.E., 2001, International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* 33, 5-19.
- Rosenfeld, S.S., Xing, J., Cheung, H.C., Brown, F., Kar, S., Sweeney, H.L., 1998, Structural and kinetic studies of phosphorylation-dependent regulation in smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 273, 28682-28690.
- Rovner, A.S., Freyzon, Y., Trybus, K.M., 1997, An insert in the motor domain determines the functional properties of expressed smooth muscle myosin isoforms. *J Muscle Res Cell Motil* 18, 103-110.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850-858.
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., Springer, T.A., 2011, Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 474, 343-349.

- Siegman, M.J., Butler, T.M., Mooers, S.U., Trinkle-Mulcahy, L., Narayan, S., Adam, L., Chacko, S., Haase, H., and Morano, I. 1997. Hypertrophy of colonic smooth muscle: contractile proteins, shortening velocity, and regulation. *Am J Physiol* 272:G1571-1580.
- Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1994, Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res* 18, 138-143.
- Sweeney, H.L., Rosenfeld, S.S., Brown, F., Faust, L., Smith, J., Xing, J., Stein, L.A., Sellers, J.R., 1998, Kinetic tuning of myosin via a flexible loop adjacent to the nucleotide binding pocket. *J Biol Chem* 273, 6262-6270.
- Swinburne, J.E., Bogle, H., Klukowska-Rotzler, J., Drogemuller, M., Leeb, T., Temperton, E., Dolf, G., Gerber, V., 2009, A whole-genome scan for recurrent airway obstruction in Warmblood sport horses indicates two positional candidate regions. *Mamm Genome* 20, 504-515.
- Tesarowski, D.B., Viel, L., McDonell, W.N., Newhouse, M.T., 1994, The rapid and effective administration of a beta 2-agonist to horses with heaves using a compact inhalation device and metered-dose inhalers. *Can Vet J* 35, 170-173.
- Tuck, S.A., Maghni, K., Poirier, A., Babu, G.J., Periasamy, M., Bates, J.H., Leguillette, R., and Lauzon, A.M. 2004. Time course of airway mechanics of the (+)insert myosin isoform knockout mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:326-332.
- Watanaveeradej, V., Simasathien, S., Nisalak, A., Endy, T.P., Jarman, R.G., Innis, B.L., Thomas, S.J., Gibbons, R.V., Hengprasert, S., Samakoses, R., et al. 2011. Safety and immunogenicity of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine in flavivirus-naïve infants. *Am J Trop Med Hyg* 85:341-351.
- White, S., Martin, A.F., Periasamy, M., 1993, Identification of a novel smooth muscle myosin heavy chain cDNA: isoform diversity in the S1 head region. *Am J Physiol* 264, C1252-1258.
- Wilson, J.W., Li, X., and Pain, M.C. 1993. The lack of distensibility of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 148:806-809.
- Woodman, L., Siddiqui, S., Cruse, G., Sutcliffe, A., Saunders, R., Kaur, D., Bradding, P., Brightling, C., 2008, Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *J Immunol* 181, 5001-5007.
- Woods, P.S., Robinson, N.E., Swanson, M.C., Reed, C.E., Broadstone, R.V., Derksen, F.J., 1993, Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J* 25, 208-213.

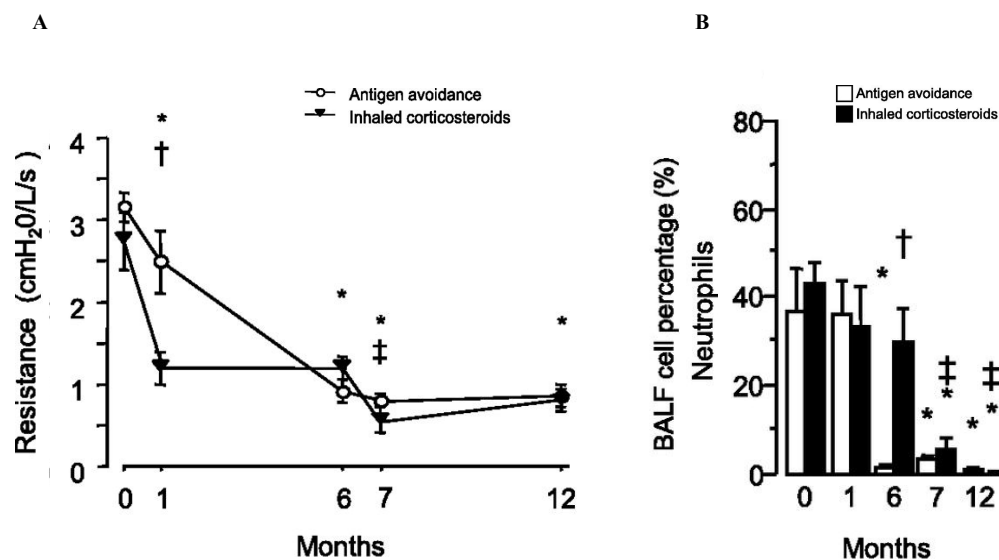
Annexe A

| | |
|---------|-----------------------|
| Human | ---SITQGPSFAYGELEK--- |
| Rat | ---SITQGPSFAYGELEK--- |
| Cat | ---SITQGPSFAYGELEK--- |
| Chicken | ---SITQGPSFSYGELEK--- |
| Horse | ---SITQGPPLAYGELEK--- |
| Dog | ---SITQGPALAYGELEK--- |

Annexe A1: Sequence comparison of homologous of SMMHC in different species. Grey box highlights the 7-amino-acid insert in the motor domain of the protein.

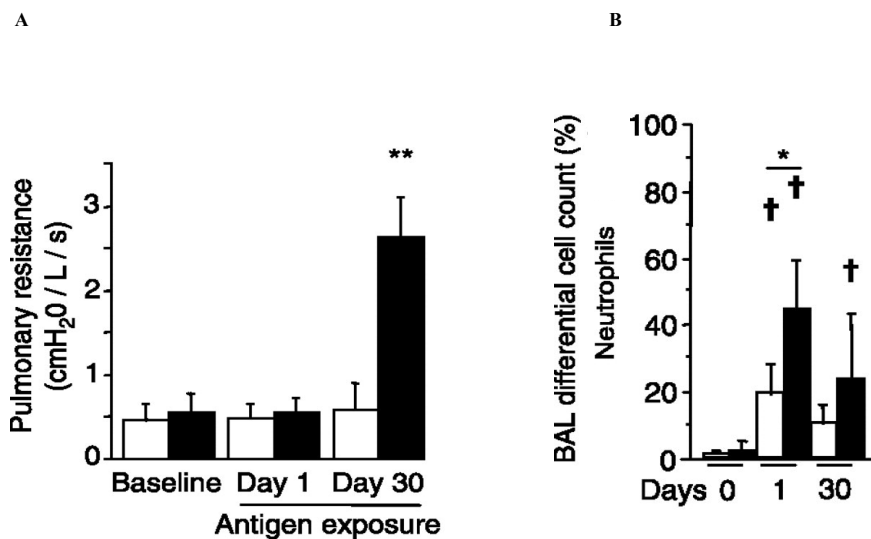


Annexe A2. Experimental design for study 2. Eleven heaves-affected horses were housed indoors and exposed to hay until they all showed clinical signs associated with airflow limitation (Month 0). Treatment consisted of strict antigen avoidance by put 5 horses on pasture as sole therapy (Antigen avoidance group). The remaining 6 horses were treated with inhaled corticosteroids (Fluticasone group); they remained exposed to hay for the first 6 months, and then were turned out on pasture for the second half of the study.



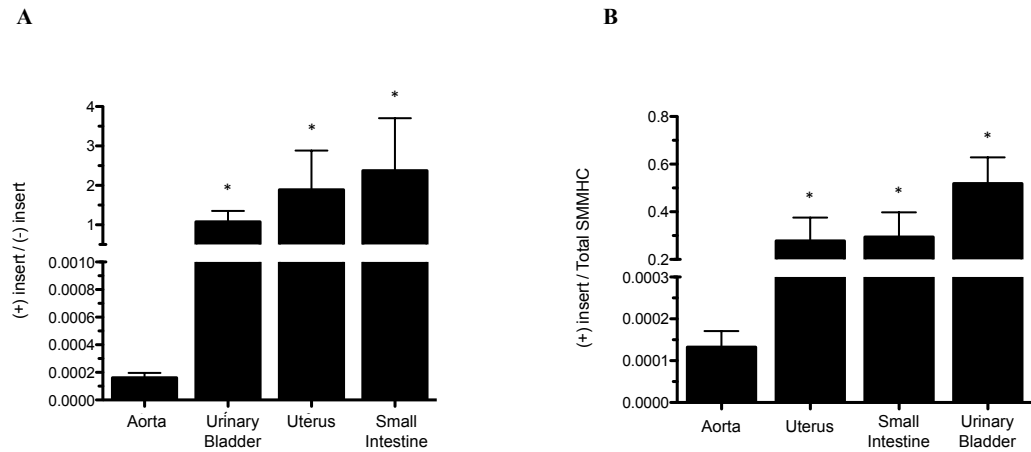
Annexe A3. Physiological data of horses in study 2. (A) Pulmonary function. Pulmonary resistance of heaves-affected horses after antigen exposure (Baseline) and after 1, 6, 7, and 12 months of treatment with antigen avoidance alone (open circles; $n = 5$) or inhaled corticosteroids (ICS, solid triangles; $n = 6$). Antigen exposure persisted for the first 6 months of treatment in the ICS group; antigen avoidance was combined with ICS from Months 6–12. Values represent means \pm SEM. *Different from baseline (both groups). †Different between groups at the same time point. ‡Different from 6 months (ICS only), $P \leq 0.05$. **(B)** Bronchoalveolar lavage (BAL) cytology. Percentage of neutrophils in airways of heaves-affected horses after antigen exposure (baseline = Month 0) and after 1, 6, 7, and 12 months of treatment with antigen avoidance alone (open bars; $n = 5$) or inhaled corticosteroids (solid bars; $n = 6$). Antigen exposure persisted for the first 6 months of treatment in the ICS group. Values represent means \pm SEM. *Different from baseline in the same group. †Different from antigen avoidance at the same time point. ‡Different from 6 months in the same group. $P \leq 0.05$.

Tiré de Leclere et al., 2012.



Annexe A4. Physiological data of horses in study 3. (A) Pulmonary resistance after 3 months of antigen avoidance (Baseline) and after 1 and 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses, $n = 6$; control horses, $n = 5$. Mean \pm SD. **Different from Baseline and Day 1 within the same group, and different from controls at the same time point, $P < 0.01$. (B) Percentage of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) after 3 months of antigen avoidance (baseline = Day 0), and after 1 and 30 days of antigenic exposure. Heaves-affected horses, $n = 6$; control horses, $n = 5$. Mean \pm SD. *Different between groups at one time point. †Different from baseline within the same group, $P < 0.05$.

Tiré de Leclere et al., 2011a.



Annexe A5. Expression of (+)insert myosin isoform in horses' organs. Total RNA was extracted from 4 subjects. mRNA expression of (+) and (-)insert isoform was analyzed by real-time PCR with appropriate negative control. Expression of (+)insert isoform represent the mean value +/- SEM of quantified levels from experiments performed in duplicate i.e., two repeats on the same RNA sample. **(A)** Expression of (+)insert isoform reported on expression of (-)insert isoform. *: Different from aorta. **(B)** Expression of (+)insert isoform normalized by total SMMHC. *: Different from aorta.

Annexe B

Tableau II : Amorces et conditions PCR pour les gènes équins de l' α -actine et de TGF- β 1.

| Gène | Amorces (5' → 3') | Taille de l'amplicon (pb) | Cycle PCR |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| α -actine | sens AGCGTGGCTACTCCTTTGTGACTA | 224 | 95 °C-15 sec |
| | antisens CATCCCGATGAAAGATGGCTGGAA | | 55 °C-25 sec 72 °C-25 sec |
| TGF- β 1 | sens CAGCATGTGGAGCTGTACCAGAAA | 106 | 95 °C-15 sec |
| | antisens TGACATCAAAGGACAGCCATTCCG | | 55 °C-25 sec 72 °C-25 sec |

