

Université de Montréal

**Expression des cofacteurs de transcription associés au
SRF dans le muscle lisse respiratoire équin**

par

Mylène Chevigny

Département des 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

Décembre, 2013

© Mylène Chevigny, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Expression des cofacteurs de transcription associés au SRF dans le muscle lisse
respiratoire équin

Présenté par :
Mylène Chevigny

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Jean, président-rapporteur
Jean-Pierre Lavoie, directeur de recherche
Christopher Price, membre du jury

Résumé

L'hyperplasie et l'hypertrophie contribuent à l'augmentation de la masse de muscle lisse bronchique observée dans le souffle. Les cellules musculaires lisses (CML) présentent deux phénotypes; prolifératif ou contractile. Le *serum response factor* (SRF), un facteur de transcription impliqué dans l'activation de nombreux gènes, contribuerait à cette modulation phénotypique. Notamment, lorsqu'associé au cofacteur Elk-1, un phénotype prolifératif serait observé, alors qu'en présence de la myocardine (MYOCD) il y aurait induction d'un profil contractile. Récemment, il a été démontré que SRF est surexprimé dans les voies périphériques chez les chevaux atteints du souffle suite à une exposition antigénique. Cette étude vise à caractériser l'expression protéique et génique de SRF, Elk-1 et MYOCD dans les CML des voies respiratoires centrales et périphériques chez des chevaux atteints du souffle et des chevaux contrôles.

L'évaluation de l'expression protéique de SRF, Elk-1 et MYOCD s'est effectuée par immunodétection sur des tissus provenant de biopsies thoracoscopiques ou endobronchiques, et ce, avant, à 1 et 30 jours du défi antigénique. L'expression génique a été étudiée par qPCR sur du muscle lisse disséqué de la trachée, et des bronches, ainsi que sur des voies respiratoires intermédiaires et périphériques.

Les expressions génique et protéique de MYOCD sont augmentées uniquement dans les voies périphériques. L'expression génique de SRF et Elk-1 varient dans les voies centrales alors que le taux de protéines demeure stable.

En conclusion, SRF et MYOCD pourraient être impliquées dans l'hypertrophie des voies respiratoires périphériques dans le souffle alors que l'hyperplasie ne semble pas être activée par Elk-1.

Mots-clés : Elk-1, hyperplasie, hypertrophie, MYOCD, muscle lisse respiratoire, phénotype, souffle, SRF

Abstract

Airway smooth muscle (ASM) cells hyperplasia and hypertrophy contribute to the increased airway smooth muscle mass present in heaves. ASM cells express either a synthetic proliferative or a contractile phenotype. Serum response factor (SRF) is a transcription factor that has been shown to regulate myocyte differentiation in vitro in vascular and intestinal smooth muscles. When SRF is associated with Elk-1, it promotes ASM proliferation while myocardin (MYOCD) promotes the expression of contractile elements. Recently, SRF was shown to be overexpressed in the peripheral airways of heaves affected horses following an antigenic challenge. The objective of this study was to characterize the protein and gene expression of SRF, Elk-1 and MYOCD in ASM cells from central and peripheral airways of heaves affected horses and controls.

Protein expression of Elk-1 and MYOCD was evaluated using immunohistochemistry while immunofluorescence was used for SRF detection in pulmonary peripheral and endobronchial biopsies before and at 1 and 30 days of antigenic exposure. Gene expression was investigated in ASM cells dissected from trachea and bronchi as well as from intermediate and peripheral airways using qPCR.

MYOCD gene and protein expressions are increased only in peripheral airways. SRF and Elk-1 gene expression varied in the central airways while the positive cell percentage remains stable.

In conclusion, the pulmonary peripheral airways hypertrophy observed in heaves seems to implicate SRF and MYOCD while the hyperplasia doesn't seem to be activated by Elk-1.

Keywords : Airway smooth muscle, Elk-1, heaves, hyperplasia, hypertrophy, MYOCD, phenotype, SRF

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations et symboles.....	x
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
1. Chapitre 1 : Recension de la littérature.....	2
1.1 Mécanique de la respiration.....	2
1.2 Description du souffle chez le cheval	3
1.3 Composantes du remodelage tissulaire	4
1.3.1 Processus inflammatoire	5
1.3.2 Pathophysiologie.....	6
1.4 La cellule musculaire lisse	7
1.5 Facteurs de transcription	11
1.5.1 SRF (<i>serum response factor</i>)	14
1.5.1.1 Caractérisation	14
1.5.2 Cofacteurs de SRF	16
1.5.2.1 Elk-1	18
1.5.2.2 Myocardine (MYOCD).....	21
1.7 Hypothèse et objectifs.....	24
1.7.1 Hypothèse.....	24
1.7.2 Objectifs	25
2. Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	26
2.1 Animaux.....	26
2.1.1 Étude préliminaire.....	26

2.1.2 Étude principale	26
2.2 Fonctions pulmonaires et lavages bronchoalvéolaires (LBA)	27
2.3 Tissus	28
2.3.1 Échantillons post-mortem	28
2.3.2 Biopsies pulmonaires via thoracoscopie	28
2.3.3 Biopsies endobronchiques	29
2.4 PCR en temps réel	29
2.4.1 Extraction d'ARN	29
2.4.2 Transcription inversée (RT)	30
2.4.3 PCR quantitatif en temps réel	30
2.4.3.1 Courbe standard	31
2.5 Immunodétection	32
2.5.1 Anticorps (Ac)	32
2.5.2 Immunobuvardage de type western (WB)	32
2.5.3 Immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF)	33
2.6 Mesures morphométriques	34
2.6.1 Biopsies pulmonaires	34
2.6.2 Biopsies endobronchiques	34
2.7 Analyses statistiques	35
3. Chapitre 3 : Résultats	36
3.1 Étude préliminaire : expression génique du SRF, d'Elk-1 et de la MYOCD dans les tissus respiratoires	36
3.2 Étude principale	40
3.2.1 La fonction pulmonaire et la cytologie des lavages bronchoalvéolaires	40
3.2.2 Immunobuvardage	41
3.2.3 Expression de SRF	42
3.2.4 Expression Elk-1	44
3.2.5 Expression MYOCD	46
3.2.6 Expression génique corrigée	48
4. Chapitre 4. Discussion	52

4.1 Expression protéique.....	52
4.2 Expression génique	54
5. Chapitre 5. Conclusion et perspectives	58
Bibliographie.....	60
Annexe A	xvi
Annexe B.....	xvii
Annexe C : Protocoles IF pour le SRF.....	xix
Annexe D : Protocole Extraction d'ARN total avec le phénol/chloroforme	xxii
Annexe E : Protocole pour l'extraction d'ARN sur la colonne de biopsies endobronchiques	xxiv
Annexe F : Protocole de purification de la transcription inverse.....	xxvi
Annexe G : Protocole pour la transcription inverse.....	xxvii
Annexe H : Protocoles pour l'IHC.....	xxix

Liste des tableaux

Table 1. Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des myoblastes.....	9
Table 2. Cofacteurs de SRF	17

Liste des figures

Figure 1. Évolution de la cellule mésenchymateuse vers les cellules musculaires.....	8
Figure 2. Plasticité du phénotype de la cellule musculaire lisse mature.....	10
Figure 3. Complexe basal de transcription et éléments essentiels à la transcription d'un gène. <i>Adapté de Farnham, 2009.</i>	12
Figure 4. Similitude entre les domaines au sein d'une famille de facteurs de transcription. <i>Tiré de Wasylyka et al, 1998.</i>	13
Figure 5. Schéma de l'équilibre entre les deux phénotypes des myocytes. <i>Adapté de Miano et al, 2006.</i>	15
Figure 6. Organisation des membres de la sous-famille des TCF (<i>ternary complex factors</i>). <i>Tiré de Buchwalter et al., 2004.</i>	19
Figure 7. Présentation des membres de la famille des MRTF (<i>myocardin related transcription factors</i>). <i>Adapté de Olson et Nordheim, 2010.</i>	23
Figure 8. Schéma expérimental de l'étude principale des expressions génique et protéique.....	27
Figure 9. Données respiratoires de la phase préliminaire.	37
Figure 10. Résultats géniques préliminaires du SRF, d'Elk-1 et de la MYOCD.	38
Figure 11. Phase préliminaire : données brutes de l'expression des gènes de référence.	39
Figure 12. Données respiratoires de l'étude principale. <i>Tiré de Leclère, 2011a.</i>	40
Figure 13. Résultats du WB pour SRF, Elk-1 et MYOCD.....	41
Figure 14. Expression du SRF dans les myocytes des biopsies endobronchiques.	43
Figure 15. Expression d'Elk-1 dans les myocytes des tissus pulmonaires.	45
Figure 16. Expression de MYOCD dans les myocytes des tissus pulmonaires.....	47
Figure 17. Biopsies endobronchiques : données géniques corrigées.	49
Figure 18. Biopsies pulmonaires : données géniques corrigées.....	50
Figure 19. Comparaison entre l'expression génique et protéique.....	50

Liste des abréviations et symboles

α -actine	alpha-actine du muscle lisse
Ac	anticorps
ASM	<i>airway smooth muscle</i> , muscle lisse respiratoire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
B2M	<i>β2 microglobulin</i> , β 2-microglobuline
°C	degré Celsius
cm ³	centimètre(s) cube
CML	cellules musculaires lisses
Ct	<i>cycle treshold</i> ; seuil de cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
E _L	élastance
ELK-1	<i>ETS-like transcription factor 1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	éthanol
ETS	<i>E-26 transformation-specific</i>
FoxC1	<i>Forkhead box protein C1</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> , glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
GUSB	β -glucuronidase
h	heure(s)
IAD	<i>inflammatory airway disease</i> , maladie inflammatoire des voies respiratoires
IEG	<i>immediate early gene</i> , gène à réponse précoce
IGF1	<i>insulin-like growth factor</i> , facteur de croissance lié à l'insuline 1
IF	immunofluorescence
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> , kinase N-terminale c-Jun
kDa	kilodalton(s)
kg	kilogramme(s)
LBA	lavage bronchoalvéolaire
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i> , acide lysophosphatidique
m	mètre(s)
M	molaire
MADS	<u>M</u> CM1, <u>A</u> gamous, <u>D</u> eficiens, <u>S</u> RF
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> , protéine kinase activée par un mitogène
MKL-1	<i>megakaryoblastic leukemia 1</i>
mg	milligramme(s)
min	minute(s)
miR	micro-acide ribonucléique
mL	millilitre(s)
mm	millimètre(s)
mM	millimole(s) par litre ou millimolaire
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique
MRF4	Myogenic regulatory factor 4
MRTF	<i>myocardin-related transcription factors</i> , facteur de transcription lié à la myocardine
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i> , facteur myogénique 5
MYOCD	myocardine
MyoD	Myoblast determination protein
Myog	myogénine
ng	nanogramme(s)
NK	cellule <i>Natural Killer</i>
Pax3	Paired box protein Pax-3
pb	paire de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , amplification en chaînes par polymérase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , facteur de croissance plaquettaire
pElk-1	Elk-1 phosphorylée

PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase A</i> , peptidyl-prolyl isomérase A
P _L	pression pulmonaire
PM	poids moléculaire
R ²	coefficient de corrélation
RAO	<i>recurrent airway obstruction</i> , obstruction récurrente des voies aériennes
R _L	Résistance
RPLP0	<i>large ribosomal protein P0</i> , grosse protéine ribosomale P0
RPS9	<i>ribosomal protein S9</i> , protéine ribosomale S9
RT	<i>reverse transcription</i> , transcription inversée
s	seconde(s)
SAP	<i>SAF-A/B</i> , <i>Acinus</i> , <i>PIAS</i>
SRE	<i>serum response element</i> , élément de réponse sérique
SRF	<i>serum response factor</i> , facteur de réponse sérique
T°p	température pièce
TAD	<i>transcriptional activation domain</i> , domaine d'activation transcriptionnelle
Tbx1	<i>T-box transcription factor</i>
TCF	<i>Ternary complex factor</i> , facteur de complexe ternaire
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , facteur de nécrose tumorale
U	unité
UBC	<i>ubiquitin C</i> , ubiquitine C
μL	microlitre(s)
μm	micromètre(s)
WB	<i>western blot</i> , immunobuvardage de western

*« Faites du cheval un compagnon et non
un esclave, vous verrez quel ami
extraordinaire il est »
Nuno Oliviera*

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Dr Jean-Pierre Lavoie, mon directeur de recherche, pour l'opportunité qu'il m'a offerte de perfectionner mes connaissances et de parfaire mes habiletés professionnelles. Vous avez contribué à la combinaison de deux passions que je croyais pourtant si loin l'une de l'autre. Me joindre à votre équipe de laboratoire a été un privilège que j'ai apprécié à chaque jour de cette aventure. Votre curiosité et votre passion pour la recherche ne laissent personne indifférent. Votre dévouement pour la transmission de vos connaissances m'a permis de pousser plus loin ma réflexion. Merci sincèrement pour votre disponibilité et pour avoir su éclairer ma lanterne dans mes quelques moments d'obscurité.

Je tiens à remercier deux merveilleuses assistantes de recherche dévouées et pleines de ressources. Vous avez su m'apporter l'encadrement et la motivation nécessaire tout au long de ces deux années. Merci Josiane Lefebvre-Lavoie pour ton sens de l'organisation autant matérielle qu'intellectuelle, ta rigueur au travail qui m'inspire ainsi que pour l'écoute dont tu as fait preuve. Merci Amandine Vargas de t'investir autant, de partager ta passion et de tout faire pour que tout fonctionne en temps. Je vous remercie sincèrement car votre présence est rassembleuse et permet une excellente cohésion entre les membres du laboratoire.

Je te remercie, Roxane Boivin, pour l'énorme coup de main que tu m'as donné dans l'exécution des nombreuses quantifications géniques en plus d'avoir accepté de répondre à mes nombreuses questions ou requêtes. Merci sincèrement.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire; Michela, Anouk, Aude, Gaëlle, Émilie, Catherina, Mireille, Pamela, Yoana sans vous, cette aventure aurait été longue et monotone. Votre présence a permis aux journées de passer rapidement. Je vous remercie infiniment pour les conseils, les trucs et les bons mots ainsi que pour les moments formidables passés en votre compagnie.

Je remercie les organismes subventionnaires de financer l'avancement de la recherche. Je remercie aussi la faculté de médecine vétérinaire pour son soutien professionnel et pour son désir de favoriser le rayonnement des projets effectués au sein de son établissement.

Je remercie tout particulièrement ma famille simplement pour être présente. Geneviève et Myriam, mes chères sœurs, vous m'avez encouragée à persévérer et à poursuivre mes rêves, de plus vous êtes une source d'inspiration et de réconfort. Céline et Robert, mes meilleurs parents, vous avez toujours soutenu mes décisions et cru en mon potentiel, je vous en serai éternellement reconnaissante. Je tiens à souligner votre patience pendant le processus d'écriture alors que mes actes de présence coïncidaient seulement avec l'heure des repas. Je vous remercie de votre appui.

Finalement, mes remerciements s'adressent à mon amoureux, Richard, pour tes encouragements à retourner aux études puis au cycle supérieur. Tu es mon plus grand admirateur et le regard que tu portes sur moi me donne des ailes, tu m'encourages à surmonter les petits tracassas comme les montagnes qui me paraissent insurmontables. Ton soutien aux cours des deux dernières années m'a permis de vivre pleinement cette expérience enrichissante. Je t'aime de tout mon cœur.

Introduction

Le souffle est une maladie respiratoire présente chez 14% des chevaux âgés de plus de cinq ans et vivant dans un climat tempéré (Hotchkiss et al., 2007). L'exacerbation est provoquée, chez les chevaux susceptibles, par une exposition aux antigènes qui se retrouvent naturellement dans le foin et la paille. Les signes cliniques observés sont la toux, une accumulation de mucus ainsi qu'une difficulté respiratoire au repos. Certains changements histologiques pulmonaires ont aussi été constatés : une hypertrophie des cellules à mucus, une altération de la matrice extracellulaire et une augmentation de la masse de muscle lisse bronchique.

Notre laboratoire s'intéresse particulièrement au remodelage du tissu musculaire lisse bronchique. Lors d'études précédentes, il a été démontré que l'augmentation de la masse de muscle lisse provient d'une hypertrophie combinée à une hyperplasie des myocytes (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a).

Il existe plusieurs facteurs de transcription participant à la plasticité phénotypique des myocytes vasculaires et intestinaux menant à un profil prolifératif (hyperplasie) ou contractile (hypertrophie) (Chen et al., 2008; Pipes et al., 2006). Dans une étude récente, nous avons démontré que le pourcentage de cellules positives au SRF est augmenté chez les chevaux atteints du souffle suite à un défi antigénique de 30 jours (Mémoire de Karine Guérin Montpetit). Suite à ce constat, et sachant que SRF stimule l'expression des gènes à la base de la mitogenèse et de la myogenèse dépendamment du cofacteur auquel il se lie, nous avons entrepris d'évaluer l'expression génique et protéique d'Elk-1 et de la MYOCD dans les voies respiratoires principales et périphériques. Ces deux cofacteurs, mutuellement exclusif lors de la liaison au SRF, sont impliqués dans la plasticité du phénotype de plusieurs types de cellules musculaires lisses (Chen et al., 2008; Pipes et al., 2006).

1. Chapitre 1 : Recension de la littérature

1.1 Mécanique de la respiration

La respiration est un processus naturel et vital. Elle est composée de 2 phases : inspiratoire et expiratoire. L'inspiration se produit suite à la contraction du diaphragme accompagnée par l'action des muscles intercostaux causant l'expansion des poumons (West, 2012), ce qui crée une pression négative à l'intérieur du parenchyme, entraînant un débit d'air allant de l'atmosphère vers les alvéoles. Ainsi, les échanges gazeux se produisent par diffusion passive à travers la membrane alvéolo-capillaire : les érythrocytes libèrent le dioxyde de carbone provenant des différentes cellules du corps et, en échange, repartent avec l'oxygène présent pour permettre une redistribution dans l'organisme. L'air vicié est expulsé de façon passive, simplement par la relaxation des muscles impliqués dans l'inspiration, ce relâchement crée une augmentation de pression à l'intérieur du poumon et chasse l'air vers l'extérieur. La paroi des voies respiratoires et ses composantes; cellules musculaires lisses et matrice extracellulaire, ainsi que l'intégrité du parenchyme pulmonaire, fournissent l'élasticité nécessaire au poumon pour la transmission des pressions permettant la respiration. Chez le cheval, on note une seconde phase expiratoire activée par les muscles abdominaux (Koterba et al., 1988).

En présence de maladies telles que l'asthme chez l'homme ou le souffle chez le cheval, le remodelage tissulaire peut altérer la respiration normale lorsqu'il est couplé avec le bronchospasme (Carter et al., 1996; Leclere et al., 2011b). En effet, l'épaississement de la paroi des voies respiratoires cause une rigidité, une diminution de l'élasticité (Carter et al., 1996), ce qui entraîne différents problèmes. Premièrement, une plus grande tension agit sur les parois des voies respiratoires, ce qui entraîne une diminution du débit ainsi qu'une augmentation de la résistance respiratoire. En second lieu, l'accroissement de la masse de muscle lisse pourrait occasionner une sévérité accrue des bronchospasmes par une augmentation de la force de contraction, causant la fermeture presque complète de certaines voies.

1.2 Description du souffle chez le cheval

Le terme « souffle » est utilisé afin de décrire un syndrome chronique d'obstruction des voies respiratoires chez le cheval adulte (âgé de plus de cinq ans). Aussi nommé "RAO" du terme anglais « *recurrent airway obstruction* », cette condition est caractérisée par des phases de bronchoconstriction, une hyperréactivité bronchique, une intolérance à l'exercice, une détresse respiratoire au repos, une inflammation des voies respiratoires ainsi qu'une production accrue de mucus (Leclere et al., 2011b). Les symptômes se manifestent quand les chevaux susceptibles à la maladie sont exposés aux poussières et aux moisissures présentes lors de la stabulation et ils sont réversibles par la mise au pâturage.

Il ne faut pas confondre le souffle avec d'autres maladies respiratoires. On utilise l'abréviation « IAD » (*inflammatory airway disease*) pour décrire une condition similaire au souffle où les chevaux présentant des symptômes moins sévères (absence de détresse respiratoire au repos) en plus d'affecter des chevaux de tous les âges (Couëtil et al., 2007). Le terme MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique) a été délaissé puisque l'appellation de cette maladie chez l'humain implique une obstruction respiratoire irréversible associée principalement au tabagisme (Pauwels et al., 2012).

La domestication des chevaux a entraîné d'énormes changements dans leur mode de vie. Ils sont maintenant confinés pour de longues périodes dans des stalles avec des litières de paille et/ou de sciure de bois et sont nourris avec du foin sec. Ces éléments sont susceptibles de contenir des allergènes et des poussières qui peuvent agresser leur système respiratoire, ce qui provoque une réaction inflammatoire que l'on considère généralement de nature allergique (Lavoie et al., 2001). Cependant, le nombre de chevaux atteints du souffle dans un climat nordique est estimé à 14% (Hotchkiss et al., 2007), signifiant que d'autres facteurs amplifient le risque de développer cette pathologie. Notamment, les prédispositions génétiques influenceraient

la prévalence de cette maladie (Couëtil and Ward, 2003; Marti et al., 1991; Swinburne et al., 2009).

Le souffle est un modèle naturel d'asthme chez l'humain (Leclere et al., 2011b), il permet l'étude de certains aspects de la pathologie qui ne peuvent être testés ou explorés chez l'homme (pour des questions éthiques) ou à l'aide de modèles murins (tel que l'effet à long terme de la maladie). L'hyperréactivité bronchique ainsi que la présence de bronchospasmes observés dans le souffle pourraient être influencés par le remodelage du muscle lisse des voies respiratoires. Ce phénomène est caractérisé par une augmentation de la masse de muscle lisse chez les sujets atteints du souffle comparativement aux sujets contrôles. Elle semble découler d'une hyperplasie des cellules musculaires lisses ou de l'hypertrophie de celles-ci (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a).

Les altérations phénotypiques sont gouvernées par une modification dans l'expression des gènes actifs. Ces changements sont associés à la présence de facteurs de transcription répondant à différents stimuli affectant les cellules. Selon les signaux extracellulaires, les myocytes adoptent un phénotype prolifératif (menant à l'hyperplasie) ou contractile (amenant l'hypertrophie).

1.3 Composantes du remodelage tissulaire

Le remodelage tissulaire est défini par une multitude de changements structuraux qui se développent au fil des ans. Par exemple, dans l'asthme, il est caractérisé par une altération dans l'intégrité de l'épithélium (Naylor, 1962), une hypertrophie des glandes à mucus et des cellules à gobelet (Glynn and Michaels, 1960) ainsi qu'une augmentation de la masse de muscle lisse (Carroll et al., 1993).

Le remodelage tissulaire est aussi observé dans d'autres maladies inflammatoires pulmonaires chroniques. Ce processus complexe implique des changements structuraux affectant la majorité des tissus composant les voies

respiratoires. Chez les sujets asthmatiques, on peut constater une prolifération des cellules épithéliales, une différenciation des cellules à gobelet, une fibrose sous-épithéliale, une néovascularisation ainsi qu'une hyperplasie et une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Siddiqui and Martin, 2008), ces modifications sont aussi présentes chez les chevaux atteints du souffle (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a; Léguillette, 2003). La somme de ces changements entraîne l'épaississement de la paroi des voies respiratoires (Nelson et al., 2003). Ces altérations importantes amplifieraient l'effet qu'a l'hyperréactivité bronchique sur l'obstruction des voies respiratoires en causant un rétrécissement de la lumière plus marqué. Plusieurs études démontrent que ce processus commence dès le début de la maladie dans l'asthme (James et al., 2009) ce qui pourrait aussi être le cas dans le souffle (Leclere et al., 2011a). Certains auteurs avancent que le remodelage pourrait être le fruit d'un dérèglement du processus de cicatrisation des tissus (Murphy and Oâ, 2010).

1.3.1 Processus inflammatoire

Il est probable que la maladie se développe chez les individus prédisposés génétiquement qui sont exposés aux poussières de l'écurie (souffle) ou à d'autres allergènes (asthme). Les particules inhalées provoquent une inflammation aiguë ainsi qu'une obstruction des voies respiratoires. Chez les chevaux susceptibles au souffle, cette inflammation est caractérisée par une neutrophilie importante dans le liquide des lavages bronchoalvéolaires (LBA) (Lavoie et al., 2001) alors que dans l'asthme humain, elle est majoritairement éosinophilique (Smith, 1992).

Dans l'asthme, l'inflammation chronique endommage les cellules épithéliales. Ces lésions stimulent la sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (Holgate et al., 2000). La présence de ces médiateurs entraîne une cascade d'activation impliquant la stimulation de la différenciation des cellules CD4⁺ en Th2 par les basophiles stimulés (Murphy and Oâ, 2010). Les cellules de type Th2 infiltrent la lumière des voies respiratoires et à leur tour libèrent des interleukines (IL-4, IL-5 et IL-

13) favorisant la production de cellules B, précurseur des cellules IgE (Murphy and Oâ, 2010; Nakagome and Nagata, 2011). Elles stimulent les mastocytes qui, par la production de TNF- α , induisent la migration dans les voies respiratoires des cellules dendritiques, cellules présentatrices efficaces. De plus, des cytokines de cellules Th1 et Th2 sont produites en grandes quantité par les cellules NK (*natural killer*) et améliorent les fonctions des autres types cellulaires (Murphy and Oâ, 2010).

1.3.2 Pathophysiologie

L'inhalation d'allergènes (poussières) déclenche une inflammation des voies respiratoires. Chez les sujets asthmatiques, on a constaté que la lumière des voies respiratoires est envahie de neutrophiles en 6 à 8 heures suite à une exposition aux IL-8 et IL-6 (Miyamoto et al., 2003; Nocker et al., 1999). Chez les chevaux atteints du souffle, des essais *in vitro* montrent que le chimiotactisme des neutrophiles augmente 1,5 heures suivant la stimulation à l'IL-8 et se poursuit pendant 5,5 heures (Franchini et al., 2000). Simultanément, il y a un développement de l'obstruction des voies respiratoires causée par des bronchospasmes, l'accumulation de mucus et l'inflammation tissulaire. Les médiateurs inflammatoires agissent sur les nerfs cholinergiques occasionnant la contraction des muscles respiratoires (Olszewski et al., 1999). L'accumulation de mucus est due à une hausse de sa production et à une altération de sa composition augmentant sa viscoélasticité (Gerber et al., 2000).

Dans les lavages bronchoalvéolaires des chevaux atteints de souffle, on observe une neutrophilie supérieure à 20% alors qu'on en dénombre moins de 5% chez les chevaux sains (Couëtil et al., 2007). L'augmentation du nombre de neutrophiles dans les voies respiratoires et leur activation anormalement élevée pourraient contribuer à la pathologie en libérant plusieurs médiateurs inflammatoires.

Chez les chevaux atteints du souffle, on note une augmentation significative de la masse de muscle lisse comparativement à celle des chevaux contrôles. D'une part,

elle est associée à une prolifération accrue des myocytes (hyperplasie) malgré la quantité de cellules apoptotiques qui augmente (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a). Le renouvellement cellulaire semble atteindre un équilibre dynamique entre la prolifération et l'apoptose puisqu'après trente jours d'exposition antigénique, il n'y a plus d'augmentation individuelle dans le nombre de cellules musculaires (Leclere et al., 2011a). En plus de ce phénomène, l'accroissement de la taille des myocytes (hypertrophie) a été démontré (Leclere et al., 2011a).

Le déroulement de la maladie est plutôt complexe. Elle est influencée par une multitude de facteurs ayant des rôles diversifiés. Leur interaction et la chronologie des événements restent incertaines.

1.4 La cellule musculaire lisse

Les cellules musculaires proviennent des cellules souches mésenchymateuses (Caplan, 1991). Par définition, ces cellules, provenant de la moelle osseuse, ne sont pas limitées à un nombre de division cellulaire. Les cellules mésenchymateuses migrent de la moelle osseuse vers les sites nécessitant leur présence. Lorsqu'elles arrivent dans leur nouvel environnement et selon les signaux perçus, elles se différencient vers le type de cellules progénitrices adéquat tel que les adipocytes, les cellules stromales, les fibroblastes, les myoblastes et les cellules ostéoprogénitrices (figure 1).

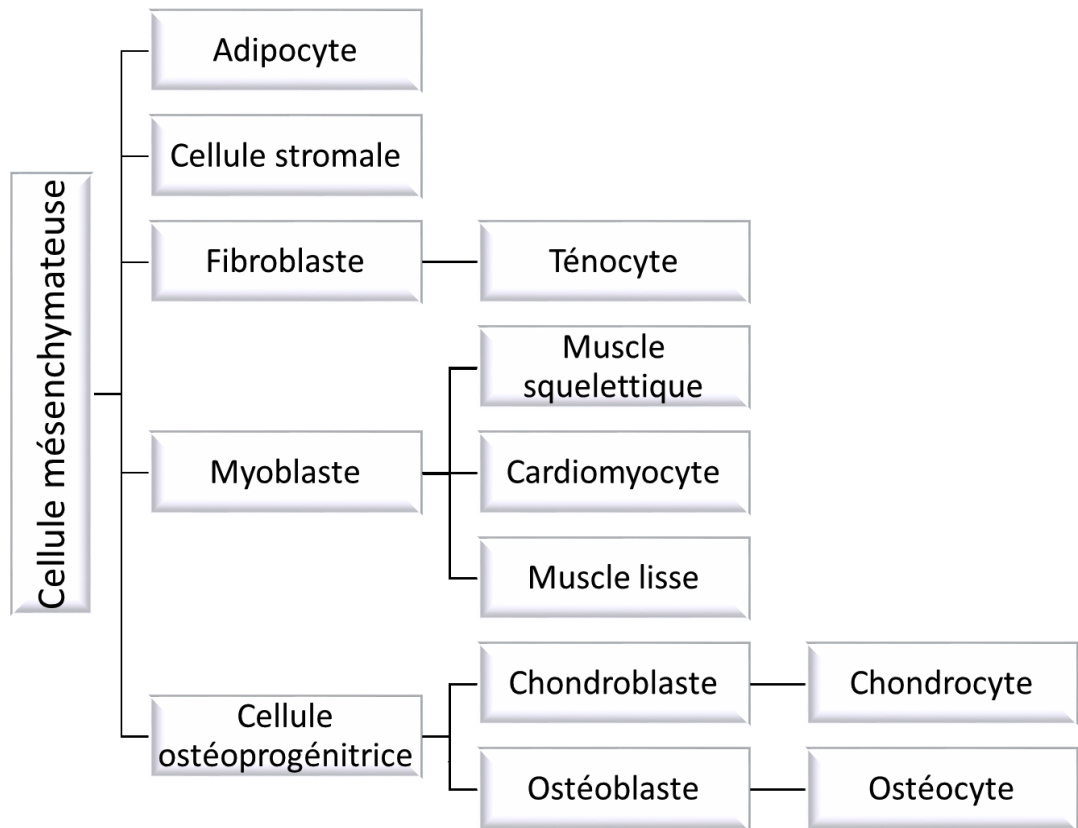


Figure 1. Évolution de la cellule mésenchymateuse vers les cellules musculaires.

Les myoblastes peuvent se différencier en 3 catégories de muscle; premièrement, sous l'influence de MyoD, Myf5, la myogénine (Myog) et Mrf4, ils progressent vers les muscles squelettiques (Megeny et al., 1996). Ensuite, l'association de Nkx2-5, GATA-4 et Mef2 favorise le développement du cœur et l'activation des gènes associés aux cellules musculaires cardiaques (cardiomyocytes) (Durocher et al., 1997). Finalement, Pax3 et Tbx1 promeuvent le développement des cellules musculaires lisses (Hirschi and Majesky, 2004).

Table 1. Principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des myoblastes étudiés chez l'humain et la souris.

Facteurs de transcription	Localisation	Fonctions
<i>MyoD</i>	Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation • Myogenèse
<i>Myf5</i>	Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation • Myogenèse
<i>Myogénine</i>	Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation • Myogenèse
<i>Mrf4</i>	Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation • Facteur myogénique
<i>Nkx2-5</i>	Muscle Cardiaque	<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation
<i>GATA4</i>	Muscle Cardiaque	<ul style="list-style-type: none"> • Favorise l'hypertrophie des cardiomyocytes
<i>MEF2</i>	Muscle Cardiaque Muscle Squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Développement musculaire • Hypertrophie cardiaque • Remodelage du tissu musculaire • Différenciation du muscle squelettique • Remodelage du tissu musculaire
<i>Pax3</i>	Muscle lisse Neurone	<ul style="list-style-type: none"> • Myogenèse • Prolifération • Migration • Apoptose • Développement neuronal
<i>Tbx1</i>	Muscle lisse	<ul style="list-style-type: none"> • Développement artériel

Les muscles squelettiques sont striés à contraction volontaire, les muscles cardiaques sont aussi striés mais à contraction involontaire alors que les muscles lisses sont non-striés et involontaires. Ces derniers se situent principalement dans les organes internes nécessitant une motilité ou un tonus.

Une caractéristique distinctive de la lignée des cellules musculaires lisses est leur capacité à changer de phénotype en réponse à une diversité de stimuli (Black and Johnson, 2002; Howarth et al., 2004). Les myocytes présentent deux phénotypes distincts : prolifératif ou sécrétoire, et contractile. Le premier est caractérisé par une

présence élevée d'organelles pour la synthèse des protéines et des lipides (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique rugueux, mitochondrie) alors que le second abonde en protéines contractiles telles que l'alpha-actine, la chaîne lourde de la myosine, la desmine et la calponine (Halayko et al., 1996; Hirota et al., 2009). La plasticité phénotypique se produit dans les cellules différenciées et se manifeste par une modulation et une maturation réversible des myocytes (figure 2) (Owens, 1995).

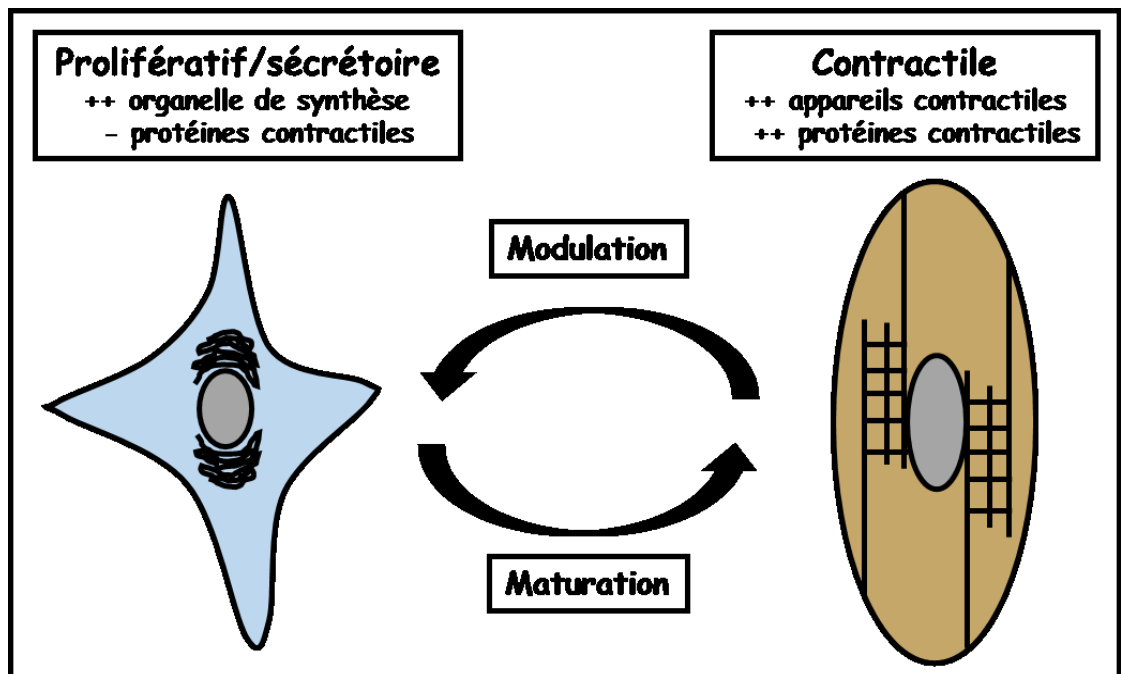


Figure 2. Plasticité du phénotype de la cellule musculaire lisse mature.

Le myocyte prolifératif/sécrétoire, possédant une bonne quantité d'organelles de synthèse (appareil de Golgi), mature vers le phénotype contractile, contenant plus de protéines contractiles, ce dernier peut revenir à l'état prolifératif par une modulation.

Les cellules musculaires lisses, en plus des fonctions proliférative et contractile, synthétisent plusieurs molécules, cytokines et chimiokines qui stimuleraient indirectement la prolifération cellulaire en attirant des cellules inflammatoires (Black and Johnson, 2002).

Dans leur phénotype contractile, le muscle lisse travaille de deux façons : phasique et tonique. Le travail phasique se fait en suivant le rythme de raccourcissement et d'élongation soit le glissement des filaments d'actine sur ceux de myosine. Quant au travail tonique, il consiste au maintien de la forme, de la dimension des organes et au tonus à tout moment (Arner et al., 2003; Murphy et al., 1997).

Pour effectuer la modulation phénotypique observée, des changements lors de la transcription des gènes doivent s'opérer. Comme toutes les cellules contiennent l'ensemble du bagage génétique d'un organisme, il doit y avoir une régulation fine de l'expression des gènes afin de pourvoir aux besoins de la cellule. Ce contrôle est effectué principalement par des facteurs de transcription.

1.5 Facteurs de transcription

Un gène est activé à la réception d'un signal soit chimique soit physique. Un assemblage protéique formé de facteurs de transcription initie, puis active la transcription. Ce complexe se lie à des régions spécifiques du brin d'ADN en amont du gène d'intérêt (Latchman, 1997; Mitchell and Tjian, 1989) dont la séquence promotrice ou promoteur est la zone indispensable à la transcription. S'il y a transcription génique, l'ARN messager produit subira un épissage afin d'engendrer une protéine fonctionnelle (Latchman, 1993).

Les facteurs de transcription se lient à une région spécifique du brin d'ADN (figure 3). La classification des différentes familles de facteurs est d'ailleurs basée sur la séquence d'acides aminés de ces domaines de liaison et leur mode de fonctionnement (Mitchell and Tjian, 1989). Chaque facteur a un rôle particulier dans le complexe formé autour du promoteur d'un gène. Il agit soit comme un activateur (*enhancer*) ou un répresseur (*silencer*) de la transcription.

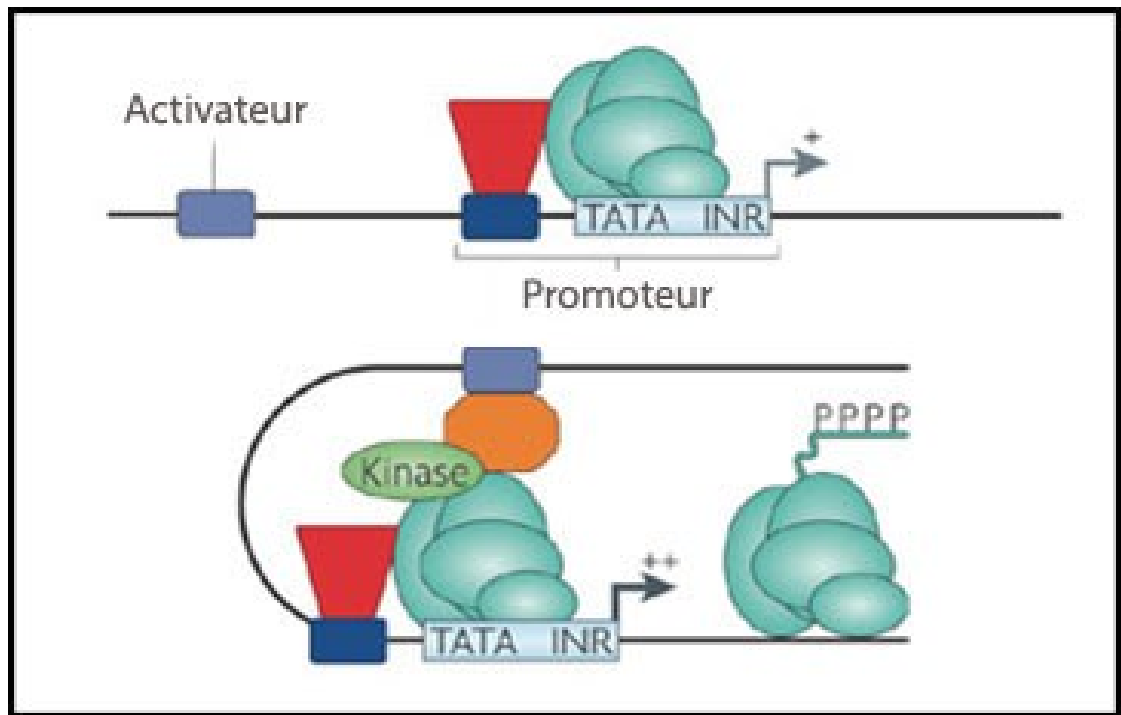


Figure 3. Complexe basal de transcription et éléments essentiels à la transcription d'un gène. *Adapté de Farnham, 2009.*

Dans la région du promoteur, le complexe basal de transcription (vert) se lie à la région TATA afin d'amorcer la transcription du gène. Un facteur de transcription (rouge) se lie à l'élément cis du brin d'ADN augmente le pouvoir transcriptionnel. Un cofacteur (orange) peut s'ajouter à la région activatrice (bleu-gris) pour stimuler davantage la transcription.

Ces actions activatrices ou répressives sont régulées selon deux stratégies. Premièrement, il y a une gestion de la synthèse des facteurs effectuée de telle sorte que certains sont exprimés exclusivement dans un type cellulaire ou alors l'induction des gènes de ces protéines dépend d'un stimulus précis (Latchman, 1997). Deuxièmement, les facteurs peuvent subir des modifications influençant leur activité par le biais d'une liaison à un ligand (ion métallique ou hormone), une variation de l'interaction avec une autre protéine ou encore sa phosphorylation.

L'organisation des facteurs autour de l'initiation de la transcription des gènes varie selon leur rôle. Les emplacements restent les mêmes qu'on parle d'activation ou

de répression, ce qui diffère est bien sûr le résultat. Des protéines peuvent se lier à un site voisin de celui d'un facteur principal et ainsi changer l'affinité au site de liaison. Il peut se former un homéo ou un hétéro multimère (deux protéines ou plus) en suspension ou directement sur l'ADN. Ces dernières protéines sont appelées des cofacteurs. L'association d'un facteur avec des cofacteurs ou des ligands entraîne une modification conformationnelle qui fait varier l'affinité avec sa cible.

Les facteurs de transcription comptent plusieurs domaines nécessaires à leur fonction (figure 4). Ils en possèdent pour la liaison à l'ADN, la transactivation et d'autres comme site de réception d'un ligand. Ils doivent avoir la séquence d'acides aminés nécessaire, la structure secondaire et la bonne conformation tridimensionnelle pour se lier au brin d'ADN du gène d'intérêt.

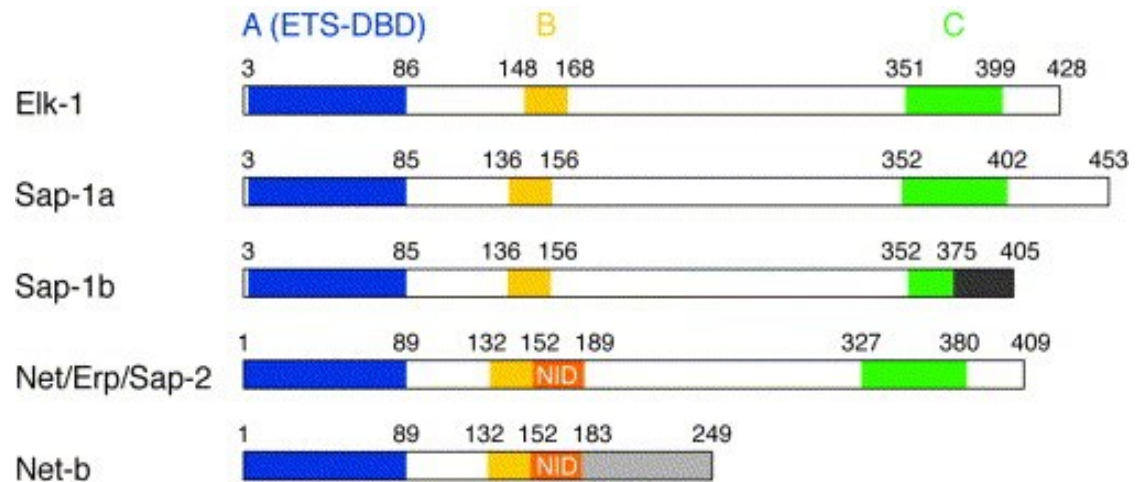


Figure 4. Similitude entre les domaines au sein d'une famille de facteurs de transcription. Tiré de Wasylyka et al, 1998.

Famille des facteurs de complexe ternaire, sous-famille des ETS (*E-26 transformation-specific*). Domaine de liaison à l'ADN (bleu), domaine d'interaction protéique (en jaune), domaine d'inhibition (orange) et domaine de transactivation (vert).

Les facteurs de transcription ont divers rôles à jouer à travers plusieurs processus biologiques; prolifération ou différenciation cellulaire, réponse immune et apoptose (Li et al., 2000). L'implication de ces protéines est la clé de la plasticité phénotypique observée dans les cellules musculaires lisses.

1.5.1 SRF (*serum response factor*)

1.5.1.1 Caractérisation

Le SRF fait partie de la famille des facteurs de transcription possédant une boîte MADS du nom des quatre membres fondateurs (*MCMI*, *Agamous*, *Deficiens*, *SRF*). Il se situe principalement dans le noyau de différents types cellulaires dont les myocytes. La localisation de SRF dans les noyaux des muscles est contrôlée par l'activité de la voie de la kinase RhoA (Camoretti-Mercado et al., 2000; Liu et al., 2003). On dénombre quatre isoformes de SRF résultant de l'épissage alternatif (Chai and Tarnawski, 2002). Malgré le retrait de certains exons, tous les isoformes de SRF conservent leur boîte MADS ainsi que leur domaine de liaison à l'ADN (Kemp and Metcalfe, 2000). SRF-L est la protéine complète qui contient 508 acides aminés dont le poids moléculaire est de 67 kDa (Norman et al., 1988). Le second isoforme, SRF-M, est déficient d'un exon. Il est présent dans la plupart des tissus, cependant, SRF-L est prédominant (Kemp and Metcalfe, 2000). Il est donc possible que l'expression des gènes spécifiques aux muscles soit modifiée également par chacun de ces deux facteurs. Le troisième variant, SRF-S, est localisé seulement dans les cellules complètement différenciées de l'aorte. SRF-I, le dernier isoforme a été détecté exclusivement dans les tissus embryonnaires et ne présente aucun domaine de transactivation; il est donc possible que ce dernier serve à inhiber SRF au stade embryonnaire (Chai and Tarnawski, 2002; Kemp and Metcalfe, 2000).

La protéine complète est composée de trois domaines : celui de liaison à l'ADN dans la région SRE (*serum response element*), un domaine de transactivation qui est situé dans la région C-terminale (Johansen and Prywes, 1993) et plusieurs sites de phosphorylation. SRF possède une région de 90 acides aminés, la boîte MADS, très bien conservée à travers les espèces permettant la dimérisation, la liaison à l'ADN et aux cofacteurs (Norman et al., 1988). La région permettant la dimérisation, nécessaire à la liaison à l'ADN, est localisée en partie dans la boîte MADS et dans de la région C-

terminale (West et al., 1997). Sous la forme d'homodimère, SRF peut se fixer à la séquence CArG du SRE.

Puisque le SRF est exprimé de façon ubiquitaire, il requiert la coopération de différents cofacteurs afin d'accomplir plusieurs fonctions biologiques (Pipes et al., 2006; Wang et al., 2001). Il est contrôlé par une variété de signaux biochimiques découlant de plusieurs situations telle qu'une blessure. Chaque activation de SRF est associée soit à la transduction d'un signal, soit à la liaison avec un facteur de transcription ou un cofacteur (Chai and Tarnawski, 2002).

Le SRF est important pour l'équilibre entre le phénotype prolifératif et contractile des cellules musculaires lisses (figure 5). Le phénotype prolifératif/sécrétoire est principalement entretenu par la liaison à un cofacteur de la famille des TCF (*ternary complex factors*) ce qui permet l'expression et l'activation des IEGs (*immediate early gene*) impliqués dans la mitose. À l'opposé, SRF doit se lier à un membre des MRTF (*myocardin-related transcription factors*) pour stimuler la différenciation en muscles lisses contractiles et favoriser l'expression de protéines contractiles (Lee et al., 2010).

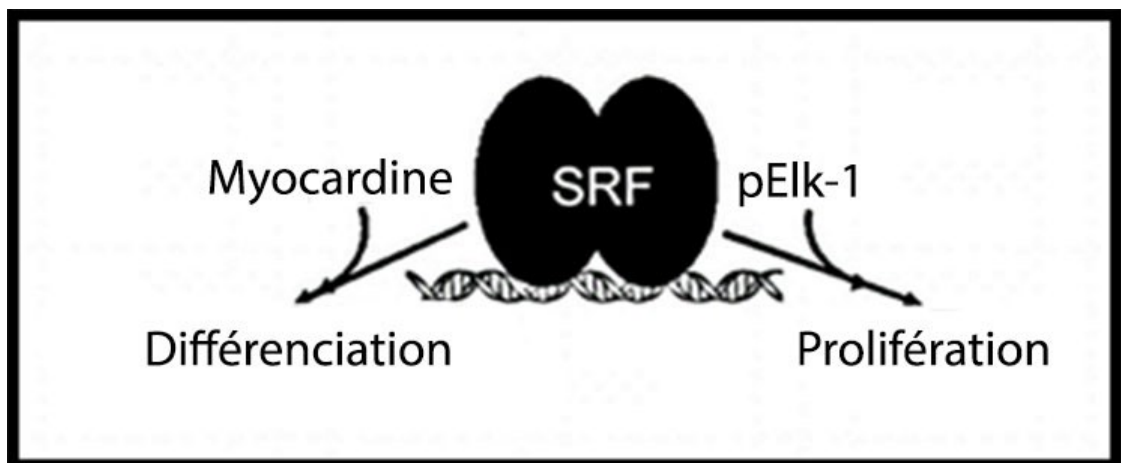


Figure 5. Schéma de l'équilibre entre les deux phénotypes des myocytes. *Adapté de Miano et al, 2006.*

L'association de la MYOCD avec le SRF entraîne la différenciation alors que la formation d'un complexe avec Elk-1 phosphorylé favorise le phénotype prolifératif/sécrétoire.

1.5.2 Cofacteurs de SRF

Il existe 2 voies de signalisation principales permettant la transcription des gènes cibles de SRF. La première voie est dépendante des facteurs de transcription de la famille des TCF (tel que Elk-1) et passe par la cascade enzymatique entraînant la phosphorylation du facteur de transcription pour faciliter sa liaison à l'ADN. Les hormones (IGF-1) ou un facteur de croissance (PDGF) passe par ERK alors que le stress (U.V., cytokines) active JNK ou p38 (Hill et al., 1995). La seconde voie est indépendante des facteurs TCF et implique une GTPase de la famille de Rho activée par le sérum ou le LPA (Hill et al., 1995).

Tel que mentionné précédemment, le SRF s'associe avec une variété de cofacteurs afin de fonctionner efficacement et spécifiquement selon le type de cellule où il se situe (table 2). Parmi toutes les possibilités, nous nous sommes attardés à deux familles de facteurs de transcription déjà étudié dans le cadre de la plasticité phénotypique dans d'autres tissus. D'une part, les membres de la famille TCF, tel qu'Elk-1, forment un complexe avec SRF qui active des IEG, tel que *c-fos*, entraînant la prolifération cellulaire (Janknecht and Nordheim, 1992; Latinkic et al., 1996). D'autre part, les membres de la famille MRTF, dont fait partie la MYOCD, jouent un rôle important dans la différenciation phénotypique des myocytes tant au niveau du système vasculaire que pour les autres types de cellules musculaires lisses (Du et al., 2003).

Table 2. Identification des cofacteurs de SRF, de leur localisation, de la fonction qui leur est associée ainsi que des gènes qu'ils activent, chez l'humain et la souris.

	Localisation	Fonction associée	Gène
<i>MYOCD</i>	Muscle cardiaque Muscle lisse	Cardiogénèse Différenciation	α -actine du muscle lisse Calponine Chaîne légère de la myosine Chaîne lourde de la myosine
<i>Elk-1</i>	Ubiquitaire	Prolifération Apoptose	c-fos
<i>SAP-1α</i> (<i>Elk-4</i>)	Ubiquitaire	Prolifération	c-fos
<i>NET</i> (<i>Elk-3</i>)	Ubiquitaire	Inhibition ou activation (Ras dépendant)	
<i>MRTF-A</i> (<i>MKL1</i>)	Ubiquitaire Muscle lisse Muscle cardiaque	Anti apoptotique Différenciation Développement Fonction	α -actine du muscle lisse α -actine cardiaque SM22
<i>MRTF-B</i> (<i>MKL2</i>)	Muscle cardiaque Muscle squelettique	Différenciation	
<i>GATA-4</i>	Muscle cardiaque	Différenciation	α -actine cardiaque ANF
<i>Nkx2-5</i>	Muscle cardiaque	Développement	
<i>Barx1b</i>	Muscle lisse	Gère l'expression	Beta tropomyosie
<i>Prrx1</i>	Muscle		Kinase de la créatine
<i>CRP1-2-</i>	Muscle cardiaque Muscle lisse	Développement Différenciation	α -actine du muscle lisse SM22 Calponine Caldesmone Chaîne lourde de la myosine
<i>MEF2</i>	Muscle cardiaque Muscle squelettique	Remodelage Différenciation	

Le complexe ternaire formé avec Elk-1 s'avère être un faible activateur de transcription tandis que l'association entre le SRF et la MYOCD est notablement plus puissant (Pipes et al., 2006). Cependant, l'association à une de ces deux familles de cofacteurs exclut automatiquement l'autre (Wang et al., 2004).

1.5.2.1 Elk-1

1.5.2.1.1 Caractérisation

Elk-1 est une protéine faisant partie de la famille des facteurs de transcription possédant un domaine ETS (*E-26 transformation-specific*), de la sous famille des TCF. Les protéines appartenant à ce groupe montrent une très grande homologie dans leur structure primaire (Karim et al., 1990). La région la mieux conservée est celle du domaine de fixation à l'ADN, qui est situé principalement dans la région C-terminale de la protéine et qui est nommé le domaine ETS (Sharrocks et al., 1997). La liaison à l'ADN se produit autour d'un noyau de nucléotides GGAA/T.

Certains facteurs, tel que Elk-1, doivent être phosphorylés afin de permettre la liaison à l'ADN et/ou à un cofacteur. La voie de phosphorylation la plus documentée dépend d'une MAP kinase (ERK-1 ou 2) qui agit alors comme un régulateur de l'activité protéique. La liaison à l'ADN par les protéines ETS se fait majoritairement sous la forme d'un monomère.

La sous-famille des TCF est reconnue pour son aptitude à former un complexe ternaire de protéines nucléaires qui se lie à une séquence régulatrice sur l'ADN favorisant la transcription d'un gène (Buchwalter et al., 2004). Dans le cas qui nous intéresse, la protéine Elk-1 forme un complexe avec SRF et la région régulatrice SRE afin d'activer le promoteur du gène *c-fos*. La structure des membres de la famille TCF comprend quatre régions similaires, les domaines A à D, auxquels peuvent s'ajouter quelques variantes (figure 6) (Buchwalter et al., 2004).

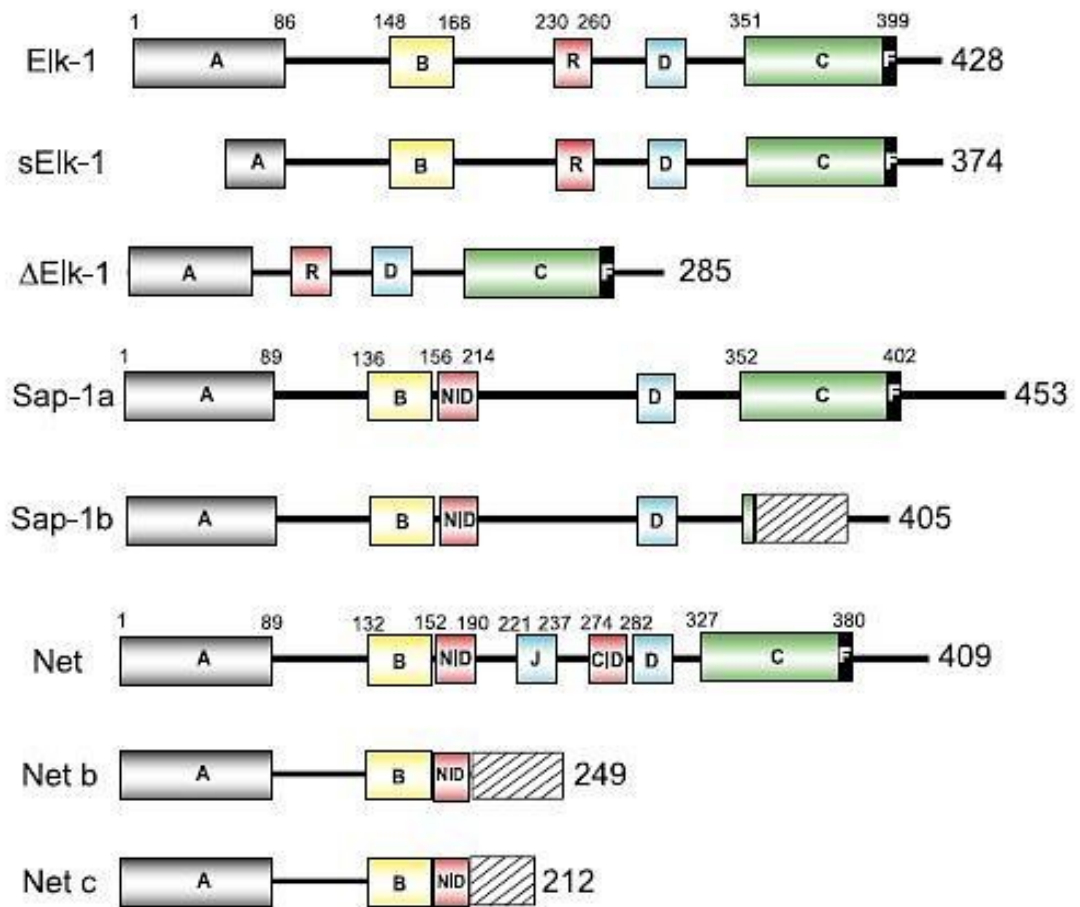


Figure 6. Organisation des membres de la sous-famille des TCF (*ternary complex factors*). Tiré de Buchwalter *al al.*, 2004.

Le domaine A (gris) sert à la liaison à l'ADN. Le domaine B (jaune) interagit avec le domaine MADS de SRF. Le domaine C (vert) contient les acides aminés pouvant être phosphorylés et il est responsable de l'activation de la transcription. Le domaine D (bleu) est le site d'ancrage pour une MAPK. Les boîtes rouges représentent des domaines de répression.

Le domaine A, celui qui se lie à l'ADN, est en position N-terminale contrairement à la majorité des autres ETS. Le domaine B ou la boîte B (*B box*) permet l'interaction avec la région MADS de SRF. Le domaine C, situé à l'extrémité C-terminale, est responsable de l'activation de la transcription en plus de contenir les acides aminés qui seront phosphorylés par une kinase. Finalement, le domaine D sert

de site d'ancrage pour MAP kinase lors de la cascade enzymatique. En plus de régions communes, certains facteurs TCF ont un domaine de répression ou un site de liaison à une autre kinase que la MAP.

Cette famille de facteurs de transcription est reconnue pour deux rôles bien documentés soit la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Vickers et al., 2004). Lorsque des facteurs de croissance ou des facteurs de stress apparaissent dans l'environnement de la cellule, une cascade enzymatique de signalisation s'enclenche. Ultimement, une kinase, telle que ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), est phosphorylée ce qui lui permet de passer la membrane nucléaire (translocation) pour aller à son tour phosphoryler une protéine TCF (Liu et al., 2007). Cette modification provoque des changements conformationnels qui permettent l'interaction avec SRF et avec l'ADN (Yang et al., 1999).

Chez l'humain, Elk-1 compte 428 acides aminés, tandis que l'homologue équin est prédit à 432. Elle se trouve dans une grande variété de tissus tels que les neurones, reins, poumons, testicules, cœur, muscles lisses et certaines cellules du système immunitaire (Shaw and Saxton, 2003; Vanhoutte et al., 2001). Il existe trois isoformes de la protéine dont deux formes sont écourtées : Δ Elk-1 et sElk-1. Δ Elk-1 est le résultat de l'épissage alternatif du gène qui diffère par l'absence du domaine de liaison avec SRF (Rao and Reddy, 1993). Comme il conserve l'aptitude de se lier à SRE, il est raisonnable de croire que ce variant pourrait avoir une fonction inhibitrice de la protéine complète. De son côté, la sElk-1 a perdu 54 acides aminés du domaine ETS (Vanhoutte et al., 2001). Cet isoforme est exclusivement nucléaire dans les neurones alors que la protéine totale se retrouve aussi dans leur cytoplasme. La forme sElk-1 a été trouvée dans quelques autres tissus tel que les poumons (Araud et al., 2007). La perte d'une partie du domaine ETS entraîne une baisse de l'efficacité à former un complexe ternaire, cependant son aptitude à lier l'ADN reste intacte. L'isoforme sElk-1 est reconnu pour inhiber la transactivation de certains gènes.

Lorsqu'il est situé dans le cytoplasme, Elk-1 se retrouve principalement sous la forme d'un dimère ce qui le protège contre sa dégradation par les protéasomes alors que dans le noyau la forme monomérique prévaut (Evans et al., 2011).

1.5.2.1.2 Rôle en association avec SRF

Elk-1 est conjugué à des SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) sur au moins trois résidus de lysine. Ces molécules gèrent la translocation de la protéine entre le noyau et le cytoplasme (Salinas and Hipskind, 2005) en plus de diminuer la transcription du gène (Yang et al., 2003). La phosphorylation d'Elk-1 lève cette inhibition ce qui la rend active et efficace. Cette étape se produit en réponse à des signaux extracellulaires activant la voie de MAP kinase incluant ERK1/2 (hormone de croissance) ou JNK (*Jun N-terminal kinase*) (stress) (Hodge et al., 1998). Les sérines phosphorylées permettent la formation du complexe ternaire et l'initiation de la transcription du gène. Un contact direct de protéine à protéine est à la base de la formation du complexe. Une séquence de 30 acides aminés comprenant le domaine B d'Elk-1 est suffisante pour créer une interaction (Ling et al., 1997) avec la région MADS de SRF. La liaison entre Elk-1 et SRF est aussi possible en l'absence de la région SRE de l'ADN (Shore and Sharrocks, 1994).

Pour permettre la liaison entre SRF et Elk-1, cette dernière doit déloger le cofacteur myocardine. L'activation d'Elk-1 dans les cellules musculaires lisses favorise la prolifération et inhibe la différenciation (Wang et al., 2004).

1.5.2.2 Myocardine (MYOCD)

1.5.2.2.1 Caractérisation

La MYOCD a été découverte à l'aide d'outils bioinformatiques lors de recherches dans le but de trouver une protéine hautement spécifique aux cellules musculaires qui s'associerait à SRF (Wang et al., 2001). Cette protéine fait partie de la

famille des protéines nucléaires possédant un domaine SAP (SAF-A/B, Acinus, PIAS) reconnu pour influencer le remodelage de la chromatine et la transcription (Wang et al., 2001). Elle se situe exclusivement et de façon constitutive dans le noyau des cellules musculaires lisses (Kuwahara et al., 2005; Parmacek, 2007). La MYOCD a été observé non seulement dans le cœur mais aussi dans les cellules musculaires lisses des stades embryonnaires et adultes (Du et al., 2003).

La MYOCD est un membre de la famille des facteurs de transcription MRTF. La majeure partie de la séquence des membres de cette famille est conservée (figure 7). Parmi plusieurs de ces domaines, le RPEL est conservé et sert à lier l'actine globulaire chez certains membres MRTF. Cette liaison empêche sa translocalisation du cytoplasme vers le noyau et ainsi contrôle la transcription de ses gènes cibles. Cependant, la MYOCD est située exclusivement dans le noyau probablement dû à la différence dans ses domaines REPL (Wang et al., 2001). Elle possède un domaine de liaison « *leucine-zipper* » qui permet soit une homodimérisation soit une hétérodimérisation avec les autres membres des MTRF (Mack and Hinson, 2005). Ils possèdent une région basique (B1) importante pour la localisation nucléaire qui, avec le domaine riche en glutamines, permet la liaison à la boîte MADS (Mack and Hinson, 2005). Ils possèdent un domaine SAP (*SAF-A/B*, *Acinus*, *PIAS*) qui régularise l'organisation nucléaire, la dynamique chromosomale ainsi que l'apoptose (Aravind and Koonin, 2000; Mack and Hinson, 2005). La partie C-terminale de la protéine contient le domaine TAD (transcriptionnal activation domain), un domaine d'activation et de transcription très puissant (Mack and Hinson, 2005; Wang et al., 2002). Les membres MRTF contrôlent l'activité de SRF durant la croissance cellulaire, la migration ainsi que la myogenèse (Pipes et al., 2006). Ces cofacteurs s'associent physiquement au domaine de la boîte MADS de SRF afin d'activer des gènes associés dans l'organisation du cytosquelette et dans la différenciation cellulaire (Parmacek, 2007).

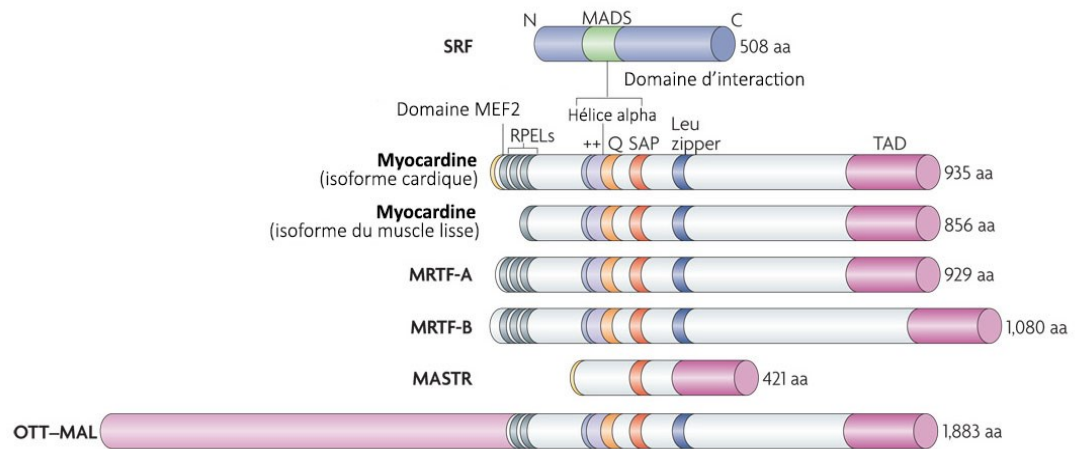


Figure 7. Présentation des membres de la famille des MRTF (*myocardin related transcription factors*). Adapté de Olson et Nordheim, 2010.

Comparaison des domaines et de la structure de ses membres. Les RPEL (gris) servent à la liaison de l'actine globulaire inhibitrice de translocalisation nucléaire. La région basique (++) et la région riche en glutamine adjacente permettent la liaison à SRF. On retrouve un domaine de dimérisation ou *leucine zipper* (bleu). Le domaine SAP (orange) agit sur la dynamique chromosomale. Le domaine TAD (fuschia) permet l'activation des gènes et la transcription.

On dénombre quatre isoformes de la myocardine (Imamura et al., 2010). La myocardine située dans les muscles cardiaques compte deux variants. Ces derniers diffèrent des autres grâce à un domaine supplémentaire de liaison à la protéine MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) (Imamura et al., 2010) et comptent 935 acides aminés (Parmacek, 2007) à plus ou moins 48 (Imamura et al., 2010). La myocardine spécifique aux cellules musculaires lisses a aussi deux isoformes (Imamura et al., 2010), cependant ils sont plus courts, près de 856 acides aminés (Parmacek, 2007).

1.5.2.2.2 Rôle en association avec SRF

La myocardine est très versatile, elle influence la myogenèse ainsi que la migration des cellules (Pipes et al., 2006). Elle est impliquée dans la transactivation de

plusieurs gènes dépendants de SRF comme SM22 alpha, l' α -actine du muscle lisse et calponine-h1 (Du et al., 2003).

Il existe des cofacteurs à MYOCD qui peuvent inhiber ou améliorer son effet en liaison avec SRF. Par exemple, Foxo4, lorsqu'il est associé à MYOCD, agit comme un répresseur des gènes de différenciation des cellules musculaires lisses. La phosphorylation de Foxo4 par la voie d'IGF-1 stimule sa translocalisation hors du noyau et lève ainsi la répression sur MYOCD (Du et al., 2003; Liu et al., 2005).

Un changement conformationnel de la chromatine est nécessaire pour permettre la différenciation en cellules musculaires lisses contractiles. La liaison du domaine TAD de la MYOCD avec une histone acétyltransférase améliore la transcription des gènes des cellules musculaires lisses. Lorsque MYOCD se lie à une histone déacétylase de classe 2, il y a suppression de la transcription des gènes dépendants de SRF (Mack and Hinson, 2005; Pipes et al., 2006).

Lors de la liaison de MYOCD avec SRF, cette dernière se trouve sous la forme d'un homodimère. Elle se lie au SRF afin d'activer la différenciation phénotypique des myocytes vers le profil contractile (Du et al., 2003).

1.7 Hypothèse et objectifs

1.7.1 Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse qu'Elk-1 et MYOCD couplé à SRF contribuent au remodelage du muscle lisse bronchique dans le souffle soit par le phénomène d'hyperplasie ou celui de l'hypertrophie selon le cofacteur étudié (dans l'ordre).

1.7.2 Objectifs

Nos objectifs sont (1) d'évaluer l'expression de SRF, de Elk-1 et de la MYOCD dans les muscles lisses respiratoires et (2) d'estimer l'effet d'un défi antigénique de 30 jours sur ces cofacteurs.

2. Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Animaux

Vingt et un chevaux de différentes races provenant du troupeau de recherche de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Montréal ont été étudiés. Les chevaux atteints du souffle montraient, depuis 3 à 10 ans, une détresse respiratoire, une inflammation ainsi qu'une obstruction des voies respiratoires lors d'exposition au foin poussiéreux tandis que les chevaux contrôles ne présentaient aucune anomalie respiratoire. Le groupe des chevaux atteints du souffle comptait 6 juments et 5 hongres ayant un âge moyen de $19,1 \pm 3,3$ ans et pesant $470,3 \pm 26,8$ kg. Chez les contrôles, il y avait 8 juments et 2 hongres dont l'âge et le poids moyens étaient de $16,0 \pm 3,1$ ans et $480 \pm 46,2$ kg.

Les manipulations sur les animaux ont été exécutées selon les lignes directrices du conseil canadien de protection des animaux.

2.1.1 Étude préliminaire

Afin d'évaluer l'expression génique de SRF, Elk-1 et MYOCD dans les muscles lisses respiratoires, l'étude préliminaire a été réalisée sur des tissus récupérés à l'autopsies provenant d'une cohorte de 14 chevaux. Les 6 chevaux atteints du souffle et les 8 chevaux contrôles ont été exposés au foin pour un minimum de 3 semaines avant leur euthanasie.

2.1.2 Étude principale

Afin d'apprécier l'effet d'un défi antigénique de 30 jours sur l'expression génique et protéique de SRF, Elk-1 et MYOCD, l'étude principale a été réalisée sur des biopsies prélevées à différents moments chez 11 chevaux (figure 8). Les 6 chevaux atteints du souffle et les 5 chevaux contrôles étaient au pâturage depuis au moins 3

mois (rémission) avant le début de l'étude, puis ils ont été exposés aux antigènes liés à la stabulation (dans le foin et la litière) pour une durée totale de 30 jours. Ces chevaux ont fait l'objet d'une vaste étude sur le remodelage pulmonaire dans le souffle, dont certains résultats ont déjà été rapportés (Leclere et al., 2011a).

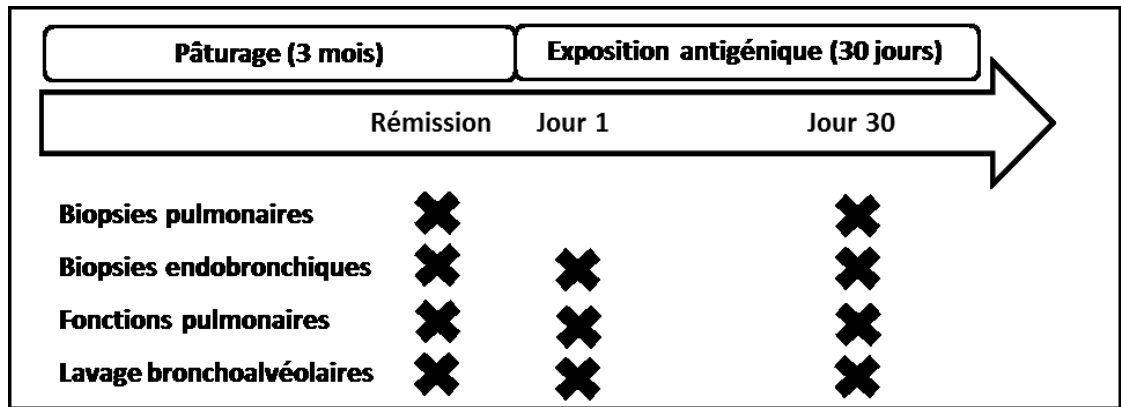


Figure 8. Schéma expérimental de l'étude principale des expressions génique et protéique.

Les fonctions pulmonaires, les lavages bronchoalvéolaires ainsi que le prélèvement des biopsies endobronchiques ont été effectués après 3 mois de pâturage (rémission), au premier et trentième jour d'une exposition antigénique. Le prélèvement des biopsies pulmonaires s'est effectué alors que les chevaux étaient en rémission et à la fin de l'exposition antigénique.

2.2 Fonctions pulmonaires et lavages bronchoalvéolaires (LBA)

La fonction respiratoire de chaque animal a été étudiée à l'aide d'un cathéter œsophagien et d'un pneumotachographe chauffé relié à un masque scellé tel que décrit précédemment (Jean et al., 2011). Brièvement, le débit d'air est mesuré en utilisant le pneumotachographe relié à un transducteur de pression. La pression transpulmonaire est estimée à l'aide du cathéter œsophagien au bout duquel se trouve un ballonnet. En se basant sur le modèle de poumon à un seul compartiment, les signaux du flux d'air et de la pression œsophagienne sont transformés mathématiquement afin d'obtenir la pression pulmonaire (P_L), l'élastance (E_L) et la résistance (R_L).

Les lavages bronchoalvéolaires ont été effectués en utilisant un bronchoscope de 2,5 m (Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan) sur des chevaux debout ayant reçu une sédation (xylazine et butorphanol) tel que précédemment décrit (Jean et al., 2011). En bref, 2 sacs de 250 mL de saline ont été instillés dans un poumon un à la fois puis aspirés immédiatement. L'identification des différentes populations cellulaires a été effectuée sur des lames de cyto centrifugation colorées à l'aide d'une coloration Wright-Giemsa modifiée (Diff-Quick, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Pour la phase préliminaire, les données de la fonction respiratoire et du lavage bronchoalvéolaire sont les dernières recueillies avant l'euthanasie. Lors de l'étude principale, les manipulations ont été effectuées lorsque les chevaux étaient en rémission, au 1^{er} et au 30^e jour de l'exposition antigénique.

2.3 Tissus

2.3.1 Échantillons post-mortem

Pour l'étude préliminaire, les voies respiratoires ont été disséquées manuellement du parenchyme et ont été classées en voies périphériques (≤ 10 mm de diamètre) ou intermédiaires (entre 10 et 25 mm de diamètre). Le muscle lisse des bronches principales et de la trachée a été disséqué sur glace. Tous les tissus ont été plongés dans l'azote liquide puis entreposés à -80 °C.

2.3.2 Biopsies pulmonaires via thoracoscopie

Pour l'étude principale, les biopsies pulmonaires périphériques ($8-12$ cm³) nécessaires pour l'étude principale ont été prélevées alors que les chevaux étaient en rémission ainsi qu'au 30^e jour de l'exposition antigénique par thoracoscopie dans la région caudo-dorsale du poumon des chevaux debout sous sédation (Relave et al., 2008). Les biopsies ont été fixées dans le formaldéhyde 4% pendant 24 heures puis

enrobées de paraffine ou elles ont été déposées dans le RNAlater (Life Technologies) et entreposées à -80 °C.

2.3.3 Biopsies endobronchiques

Pour l'étude principale, les biopsies nécessaires pour l'étude principale ont été prélevées suite à un lavage bronchoalvéolaire alors que les chevaux étaient en rémission, ainsi qu'au 1^{er} et 30^e jour de l'exposition antigénique dans le poumon controlatéral en utilisant des pinces jetables (Olympus Medical System Corp., Tokyo, Japan) tel que vu précédemment (Leclere et al., 2011a). Les biopsies ont été fixées dans le formaldéhyde 4% pendant 24 heures puis enrobées de paraffine ou elles ont été déposées dans le RNAlater (Life Technologies) et entreposées à -80 °C jusqu'à l'isolation de l'ARN.

2.4 PCR en temps réel

2.4.1 Extraction d'ARN

Afin de quantifier l'expression des gènes SRF, Elk-1 et MYOCD, l'ARN total équin a été extrait de 100 à 150 mg des tissus congelés suivants; voies respiratoires périphériques et intermédiaires, muscle lisse de bronche et de trachée et le tissu pulmonaire périphérique. L'extraction d'ARN a été effectuée à l'aide du réactif TRIzol® d'Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les indications de la compagnie. L'ARN total de 2 biopsies endobronchiques par cheval a été extrait en utilisant le RNeasy® Plus Mini Kit de Qiagen (Qiagen, Toronto, ON, CA) selon les indications de la compagnie. La pureté et la concentration d'ARN ont été évaluées par spectrométrie avec le NanoDrop ND1000 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4.2 Transcription inversée (RT)

Pour chaque échantillon, un ADN complémentaire a été généré par une réaction de transcription inverse. Pour ce faire, soit 1 µg soit 500 ng (biopsies endobronchiques) d'ARNm a subi une RT dans un volume total de 20 µL avec 1 µL de RNAsin 10 000U (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer 0,5 µg/µL, 1 µL de dNTP Mix 10 mM, 4 µL de tampon First-Strand 5X et 1 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les réactions de RT ont été faites à 65 °C durant 5 min, 50 °C pour 60 min et 70 °C pour 15 min avec un contrôle négatif approprié. Toutes les réactions ont été purifiées avec le NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) selon les instructions de la compagnie. Les produits ont été élués dans 30 µL d'eau distillée UltraPure™ exempt de Dnase ou Rnase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Tous les échantillons ont été transcrits et purifié en duplicata, p. ex. 2 répétitions de la même aliquote d'ARNm.

2.4.3 PCR quantitatif en temps réel

Dans le but quantifier les gènes SRF, Elk-1 et MYOCD, l'ADN complémentaire généré précédemment a été amplifié par PCR en temps réel. Les amorces pour chaque réaction ont été conçues afin de chevaucher une limite exon-intron afin d'éviter une amplification d'ADN génomique. Ainsi vont les paires d'amorces : l'amorce sens de SRF 5'-CCGCGTGAAGATCAAGATGGAGTT-3' et l'amorce anti-sens 5'-TGGTGATCATGGGCTGTAGTTTGC-3' (amplicon 197 pb); l'amorce sens d'Elk-1 5'-CGGGATGGTGGTGAGTTCAA-3' et l'amorce anti-sens 5'-CGCTCACTTTGCGGATGATG-3' (amplicon 148 pb), l'amorce sens de MYOCD 5'-CCATGAGCAGAGGAAACGTTTGA-3' et l'amorce anti-sens 5'-CTGGCCGGAGAGCAATCTTTTCAT-3' (amplicon 206 pb). Les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide de l'ensemble QuantiTect®SYBR® Green PCR (Qiagen, Toronto, ON, CA) dans un volume de 20 µL avec 2 µL d'ADNc purifié, 0,5 µM de chaque amorce et 10 µL de SYBR green. Toutes les réactions de PCR ont été préparées à l'aide d'un pipetteur automatique (epMotion5070 Eppendorf, Hamburg, Allemagne).

Les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide du système RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, AS). Les conditions du PCR en temps réel consistaient en une étape de dénaturation d'une durée de 10 min à 95 °C, suivi d'une amplification de 45 cycles (dénaturation à 95 °C pour 15 s, élongation à 58 °C pour 20 s et élongation à 72 °C pour 15 s) et une courbe de fusion. Les réactions ont été effectuées en duplicata, p. ex. 2 répétitions de la même aliquote d'ARNm. Chaque paire d'amorces a généré un seul produit PCR, l'identité et l'intégrité de ces produits ont été confirmées par séquençage.

2.4.3.1 Courbe standard

La quantification génique a été effectuée à l'aide de la technique de courbe standard. Il s'agit d'effectuer une PCR sur une série de dilution de l'amplicon cible, dont la concentration de départ est connue. Suite à la réaction d'amplification, un seuil (ou *threshold*) est fixé; c'est une droite qui coupe les courbes (dilution) lors de leur phase exponentielle. Le point de chaque courbe qui croise ce seuil se nomme Ct (annexe B1). Lorsqu'on reporte sur un graphique la concentration des différentes dilutions en fonction de leur Ct, nous obtenons une fonction de droite étalon (ou courbe standard) dont le R^2 (coefficient de corrélation) doit être $\geq 0,999$ (annexe B2). L'efficacité de la réaction PCR est également calculée pour chaque expérimentation. Une efficacité de 100% se traduit par un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle PCR, mais on considère en général qu'une efficacité de 90% ou plus est satisfaisante. Après l'établissement de la courbe standard, nous effectuons une réaction PCR pour le même amplicon dans les échantillons à investiguer avec des conditions identiques à celle établies pour la courbe standard (température, temps, concentration des réactifs, etc.). L'utilisation du même seuil que pour la courbe standard nous donne alors une valeur de Ct qui pourra être reportée sur la fonction de droite étalon afin de nous permettre de trouver la concentration correspondante de l'amplicon présent dans l'échantillon.

2.5 Immunodétection

2.5.1 Anticorps (Ac)

Les anticorps de lapin anti-Elk-1 (phospho S383; Abcam; ab32799) et anti-MYOCD (Covalab; pab0604) ont été utilisés lors du WB (1:500 et 1:300 respectivement) et lors de l'IHC (1:250). L'anticorps de lapin anti-SRF (G20; Santa Cruz; cs-335) a servi pour le WB (1:300) et pour l'IF (1:100). L'anticorps de souris contre l' α -actine (Sigma-Aldrich; A2547) a été utilisé pour l'IHC (1:500) et pour l'IF (1:250). L'anticorps secondaire de chèvre contre le lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (1:10 000; Cell Signaling Technology; 7074) a été utilisé pour les WB. Des anticorps secondaires biotinylés chèvre anti-lapin (1:500; JIRL; 711-065-152) ou chèvre anti-souris (1:500; BDbioscience, 550337) ont été utilisés durant les IHC. Les anticorps secondaires appropriés soit chèvre anti-lapin soit chèvre anti-souris (1:1000; Alexa 594/Alexa 488; Invitrogen; A11037/A11029) ont été utilisés lors des IF contre SRF et α -actine respectivement.

La spécificité des anticorps contre SRF, Elk-1, MYOCD et α -actine a été évaluée par l'utilisation d'isotypes spécifiques en utilisant la même concentration par exemple, IgG de lapin (Vector Laboratories; I-1000) comme contrôle négatif de SRF et Elk-1, IgG2a de souris (Sigma-Aldrich, M5409) pour α -actine et du sérum de lapin non immunisé (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. : 011-000-120) pour MYOCD.

2.5.2 Immunobuvardage de type western (WB)

100 mg de tissu pulmonaire congelé a été homogénéisé à l'aide de la technique du Polytron (Homogenizer Powergen 12, Fisher Scientific) et la concentration protéique a été mesurée en utilisant la trousse BCA Protein Assay (Fisher Scientific) selon les instructions du fabricant. La migration des aliquotes (20 μ g) s'est faite sur un gel de polyacrylamide précoulé 10% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free (Biorad,

Mississauga, ON, CA). Le transfert s'est fait sur une membrane polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Millipore; Etobicoke; ON, CA). Les membranes ont été bloquées dans une solution de lait à 5% puis elles ont subi une incubation avec les anticorps anti-SRF, anti-Elk-1 et anti-MYOCD. Après plusieurs lavages, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort et la révélation a été obtenue grâce au *BM chemiluminescence blotting substrate* (dura kit, Fisher Canada, Nepean, Canada). La visualisation des membranes a été réalisée à l'aide du système Fusion FX7 (Montreal Biotech Inc., Montreal, Canada).

2.5.3 Immunohistochimie (IHC) et immunofluorescence (IF)

Une double coloration a été effectuée sur les biopsies endobronchiques et pulmonaires périphériques mises en paraffine dans le but de révéler la présence des protéines d'intérêt au sein du muscle lisse. L'IHC a permis la détection de pElk-1 et MYOCD en utilisant leur anticorps respectif. La révélation s'est faite par l'intermédiaire d'anticorps secondaires biotinylés marqués à l'aide de la trousse DAB Peroxidase Substrate (Vector Laboratories, SK-4100). Les cellules musculaires lisses ont été détectées à l'aide de l'anticorps approprié et révélé avec un anticorps biotinylé coloré à l'aide de la trousse Vector Red alkaline phosphatase (Vector Laboratories, SK-5100). Le Vector Methyl Green (Vector Laboratories, H-3402) a servi de contre-coloration nucléaire.

L'IF a permis la colocalisation de SRF et des cellules musculaires lisses en utilisant les anticorps adéquats. La révélation s'est faite à l'aide de colorant fluorescent rouge et vert respectivement. La contre-coloration nucléaire s'est faite à l'aide du DAPI (0,5 µg/mL; Invitrogen; D3571).

2.6 Mesures morphométriques

2.6.1 Biopsies pulmonaires

Les captures d'image des IHC ont été prises à l'aide d'un microscope Leica DM4000B (Leica Microsystems Digital Imaging, U.K.) relié à une caméra Leica DFC320 (Leica Microsystems Digital Imaging, U.K.). La reconstruction des images des voies respiratoires a été obtenue en utilisant les logiciels Adobe LightRoom 3 Camera raw 6.1 (Adobe System Incorporated, U.S.A) et Photoshop CS5 (Adobe System Incorporated, U.S.A). Le comptage des noyaux positifs et négatifs a été effectué à l'aide du logiciel ImageJ64 (analysis plugin; cell counter) (1.47q, bio-format importer, National Institutes of Health). Afin de faciliter la procédure, la luminosité et le contraste ont été modifiés avec le logiciel.

2.6.2 Biopsies endobronchiques

Les images des IHC ont été obtenues grâce au système de capture en continu Panoptiq (ViewsIQ Inc., Canada) relié à une caméra Prosilica GT (Vision Technologies, U.S.A). Le nombre de noyaux totaux et positifs pour Elk-1 et MYOCD a été calculé à l'aide du logiciel VIS (Visiopharm Integrator System, Danmark) en utilisant l'outil de comptage (counting tool).

Les biopsies marquées pour SRF ont été visualisées à l'aide d'une unité confocale A1R Nikon reliée à un microscope inversé Eclipse Ti. La capture des images et leur analyse se sont faites avec NIS Element (Nikon Canada, Mississauga, Ontario, Canada). Les comptages pour SRF ont été réalisés avec le logiciel Image J64 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Pour se faire, les images ont été divisées en RGB tandis que les cellules musculaires lisses (région verte) étaient sélectionnées manuellement selon un seuil (l'établissement du seuil était suivi par une binarisation pour segmenter la région colorée). Les images binaires ont été produites suivies par la définition de la région d'intérêt. Le nombre total de noyaux et ceux

positifs pour SRF ont été successivement calculé à l'aide de l'outil d'analyse de particules.

Les comptages ont été effectués de façon aveugle.

2.7 Analyses statistiques

Les tests pairés Wilcoxon (non-paramétriques, bilatéral) ont été utilisés pour comparer l'effet du temps sur un même groupe. Alors que pour comparer les groupes entre eux, ce sont des tests Mann-Whitney (non-paramétrique, bilatéral) qui ont été effectués.

3. Chapitre 3 : Résultats

3.1 Étude préliminaire : expression génique du SRF, d'Elk-1 et de la MYOCD dans les tissus respiratoires

Les tests de la phase préliminaire ont été effectués sur des tissus pulmonaires prélevés lors d'euthanasies et ils sont disponibles dans notre Banque de Tissus Respiratoires Équins (BTRE; <http://www.ertb.ca/>).

La fonction respiratoire des chevaux atteints du souffle (n=8) démontrait une obstruction respiratoire ($R_L > 1 \text{ cmH}_2\text{O/L/s}$, $E_L > 1 \text{ cmH}_2\text{O/L}$ et le $P_L > 15 \text{ cmH}_2\text{O}$; animaux normaux : $R_L < 1 \text{ cmH}_2\text{O/L/s}$, $E_L < 1 \text{ cmH}_2\text{O/L}$ et le $P_L < 15 \text{ cmH}_2\text{O}$). De plus, ils présentaient une neutrophilie moyenne supérieure à $> 25\%$, alors que les chevaux contrôles (n=6) ont obtenus des données normales ($\leq 25\%$, voir figure 9).

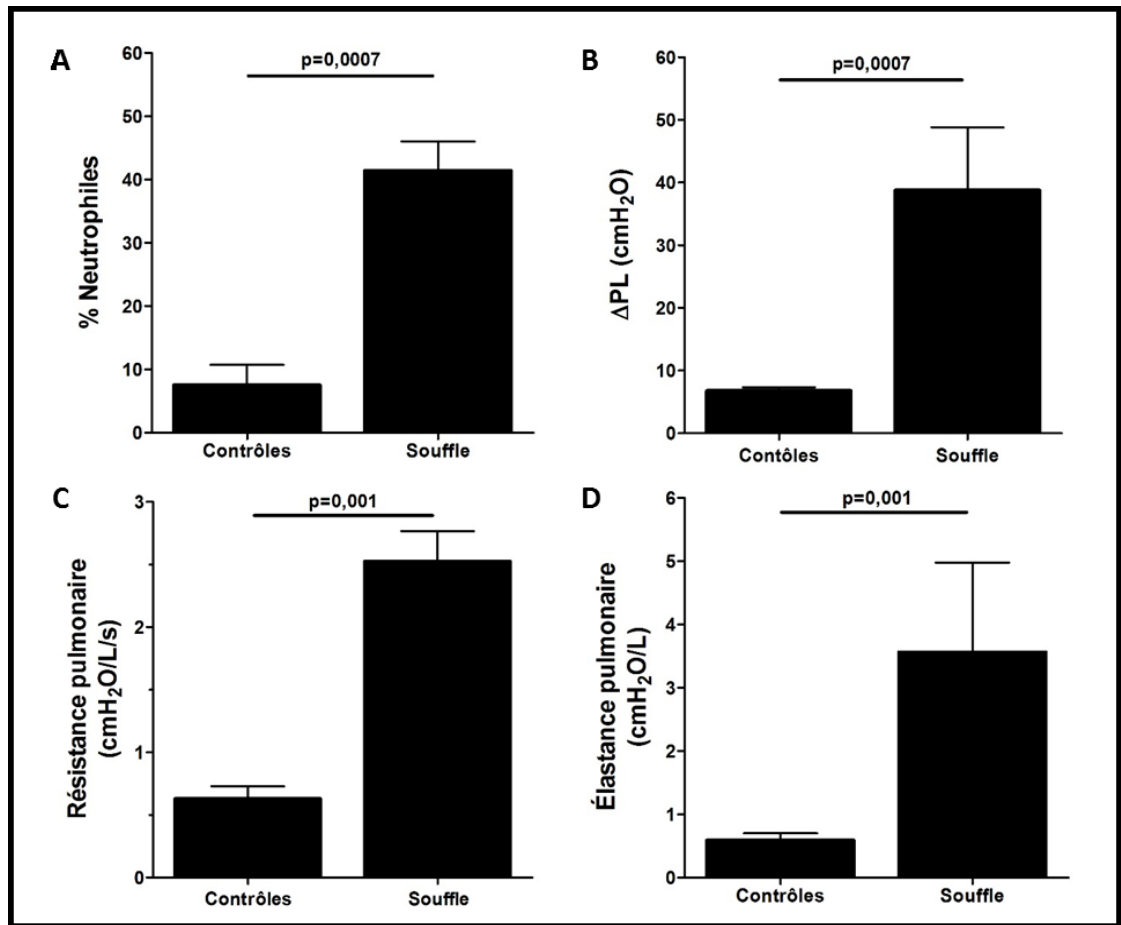


Figure 9. Données respiratoires de la phase préliminaire.

La neutrophilie pulmonaire (A) est significativement plus élevée ($p=0,0007$) chez les chevaux atteints du souffle de même que le Δ PL (B) ($p=0,0007$), la résistance (C) ($p=0,001$) et l'élastance (D) ($p=0,001$).

Les données brutes de l'expression génique (figure 10A) montraient une quantité d'ARNm supérieure de façon significative pour Elk-1 ($p=0,03$) et MYOCD ($p=0,009$) dans les voies intermédiaires des chevaux atteints du souffle en comparaison avec les chevaux contrôles. Dans le muscle bronchique, on remarque une quantité d'ARNm significativement plus élevée chez les chevaux atteints du souffle seulement pour MYOCD ($p=0,03$).

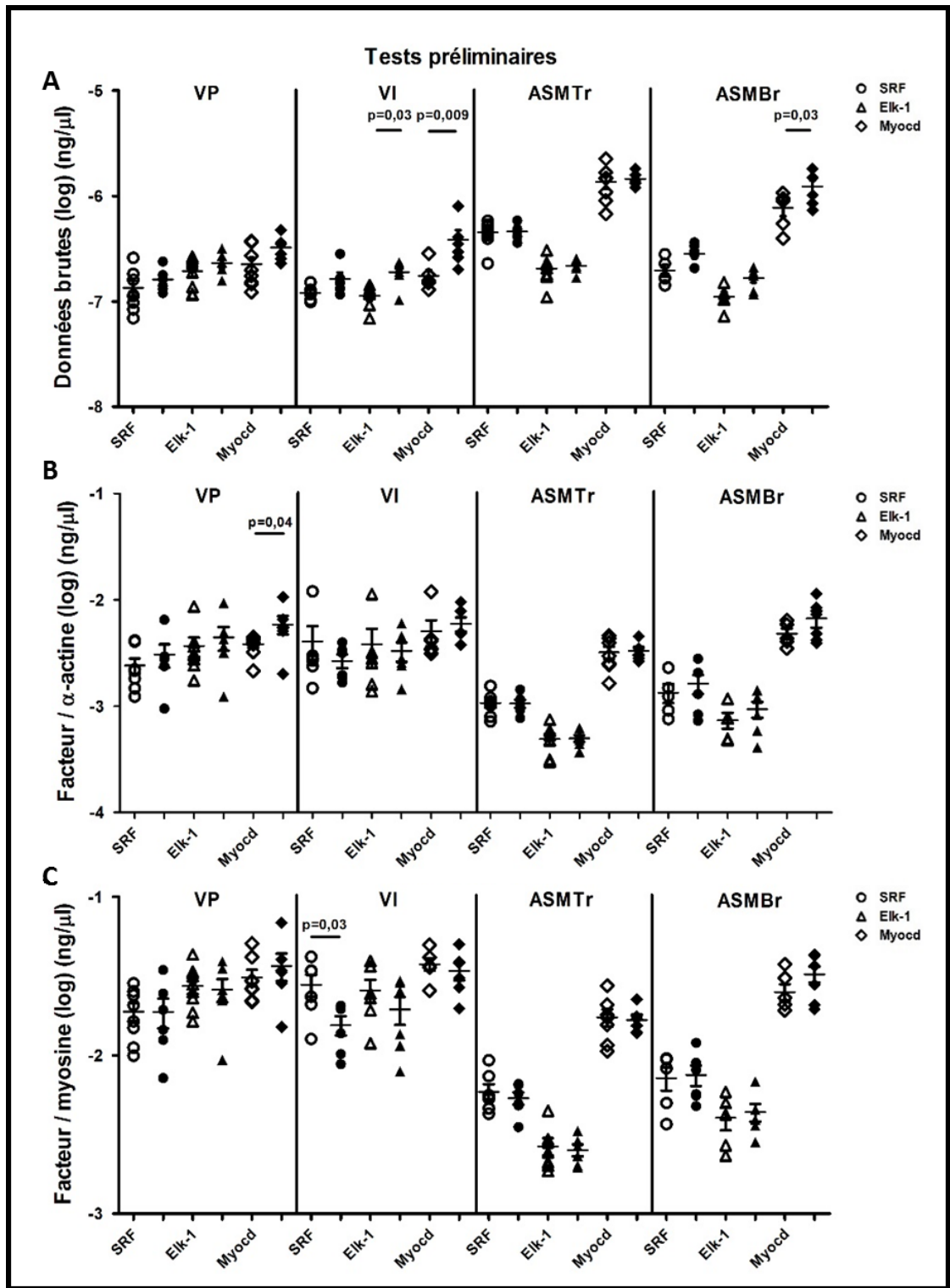


Figure 10. Résultats géniques préliminaires du SRF, d'Elk-1 et de la MYOCD.

Données brutes (A), chez les chevaux atteints du souffle, on observe une surexpression significative de Elk-1 ($p=0,03$), de MYOCD ($p=0,009$) dans les VI et de SRF ($p=0,03$) dans les ASMBr. Données corrigées par l' α -actine du muscle lisse (B), les chevaux atteints du souffle surexpriment la MYOCD ($p=0,04$) dans les VP. Données corrigées par la myosine totale (C), le SRF est surexprimé chez les contrôles dans les VI. Cercles vides : chevaux contrôles, cercles pleins : chevaux atteints du souffle. VP : biopsie pulmonaire périphérique, VI : voies intermédiaires, ASMTr : le muscle lisse de la trachée et ASMBr : le muscle lisse des bronches (ASMBr).

Les données brutes de 2 gènes de protéines contractiles, l' α -actine et la myosine totale du muscle lisse (figure 11), ont permis la correction de l'expression génique des facteurs de transcription à l'étude. Cependant, lorsque l'expression de la MYOCD est corrigée par l' α -actine (figure 10B), une expression génique significativement supérieure ($p=0,04$) apparaît chez les chevaux atteints du souffle dans les voies périphériques. La correction de l'expression de SRF par la myosine totale (figure 10C) augmente de façon significative son expression génique ($p=0,03$) chez les chevaux atteints du souffle.

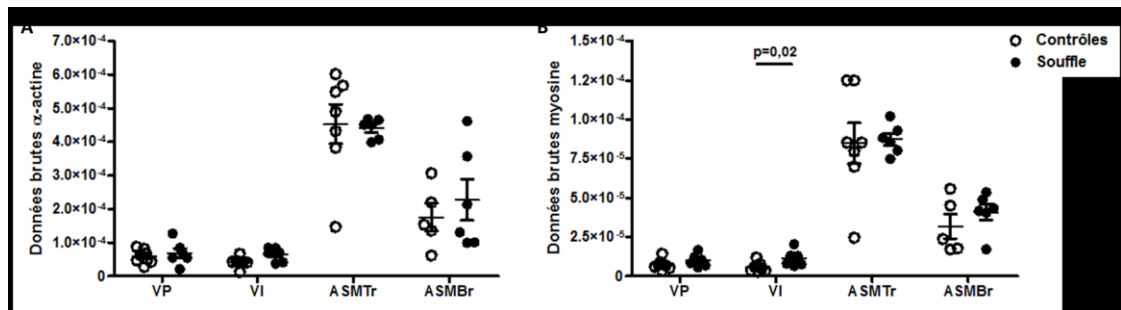


Figure 11. Phase préliminaire : données brutes de l'expression des gènes de référence. Données brutes de l' α -actine (A) et de la myosine (B). La myosine totale est surexprimée ($p=0,02$) chez les chevaux atteints du souffle dans les VI. Cercles vides : chevaux contrôles, cercles pleins : chevaux atteints du souffle. VP : biopsie pulmonaire périphérique, VI : voies intermédiaires, ASMTr : le muscle lisse de la trachée et ASMBr : le muscle lisse des bronches (ASMBr).

3.2 Étude principale

3.2.1 La fonction pulmonaire et la cytologie des lavages bronchoalvéolaires

Tel que rapporté précédemment (Leclere et al., 2011a), les chevaux atteints du souffle en rémission avaient une fonction respiratoire normale sans inflammation des voies respiratoires tel qu'estimé par la cytologie du lavage bronchoalvéolaire. L'exposition antigénique a induit une augmentation significative de la résistance et de l'élastance pulmonaire chez ces mêmes individus alors que les données sont restées stables chez animaux contrôles (figure 12A et 12B). Le défi antigénique a également causé une augmentation du pourcentage de neutrophiles dans le liquide des LBA après 1 et 30 jours d'exposition chez les chevaux atteints du souffle tandis que chez les contrôles, une augmentation transitoire a été observée au premier jour seulement (figure 12C).

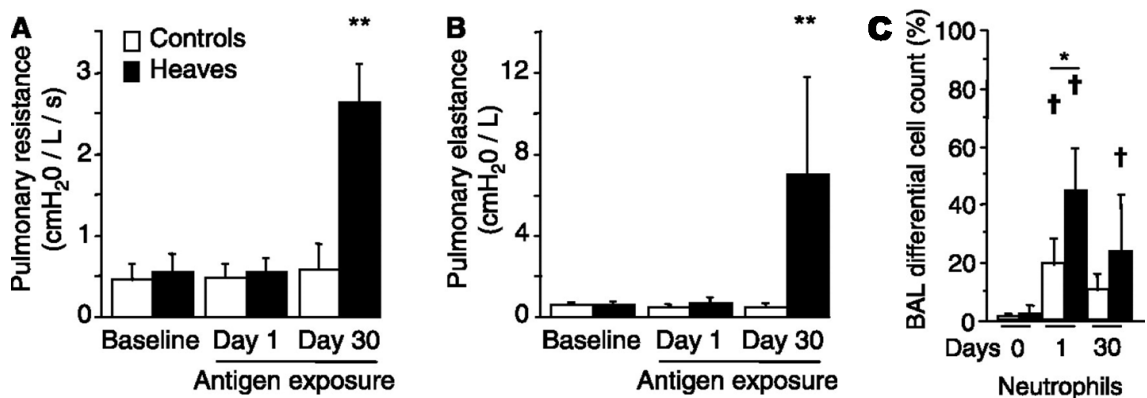


Figure 12. Données respiratoires de l'étude principale. Tiré de Leclère, 2011a.

La résistance (A), l'élastance (B) et la neutrophilie (C) pulmonaire après 3 mois de pâturage (rémission, *baseline*), 1 et 30 jours d'exposition antigénique. *Différence entre les groupes à la même période ($p < 0,05$). ** Différence entre la rémission et le jour 1 dans un même groupe et différent des contrôles à la même période ($p < 0,01$). †Différent par rapport aux données des animaux en rémission dans un même groupe. ($p < 0,05$).

3.2.2 Immunobuvardage

L'immunobuvardage de western a permis de valider la spécificité des anticorps utilisés pour effectuer les IHC et IF dans l'espèce chevaline. En effet, les 3 anticorps testés se fixent à une protéine ayant le bon poids moléculaire selon chaque anticorps; SRF : 67 kDa, phospho-Elk-1 (pElk-1) : 45 kDa et MYOCD : 102 kDa (figure 13).

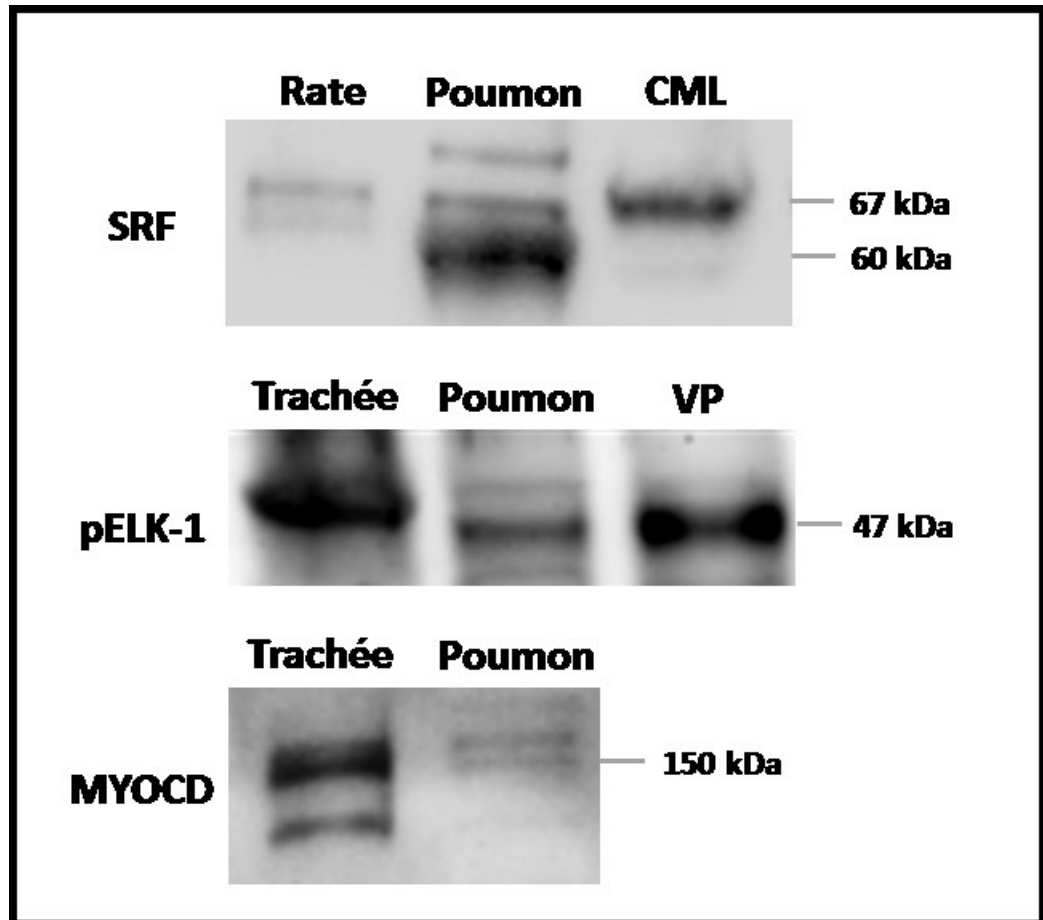


Figure 13. Résultats du WB pour SRF, Elk-1 et MYOCD.

Tous les tissus utilisés sont équins (20 µg). Le SRF a un poids moléculaire (PM) de 67 kDa, il est présent dans la rate (contrôle positif), dans le poumon et les cellules musculaires lisses en culture (CML). Le PM de pElk-1 est de 45 kDa, il est présent dans les muscles de la trachée (contrôle positif), dans le poumon et les voies périphériques (VP). Le PM de la MYOCD est de 102 kDa, elle est exprimée dans les muscles de la trachée (contrôle positif) et dans le poumon.

3.2.3 Expression de SRF

Dans les biopsies endobronchiques, il n'y a pas de différence significative dans le comptage de noyaux positifs au SRF avant ou pendant le défi antigénique. Cependant, on note une diminution significative ($p=0,03$) de l'expression brute d'ARNm chez les chevaux atteints du souffle entre la rémission et le 30^e jour d'exposition antigénique (figure 14).

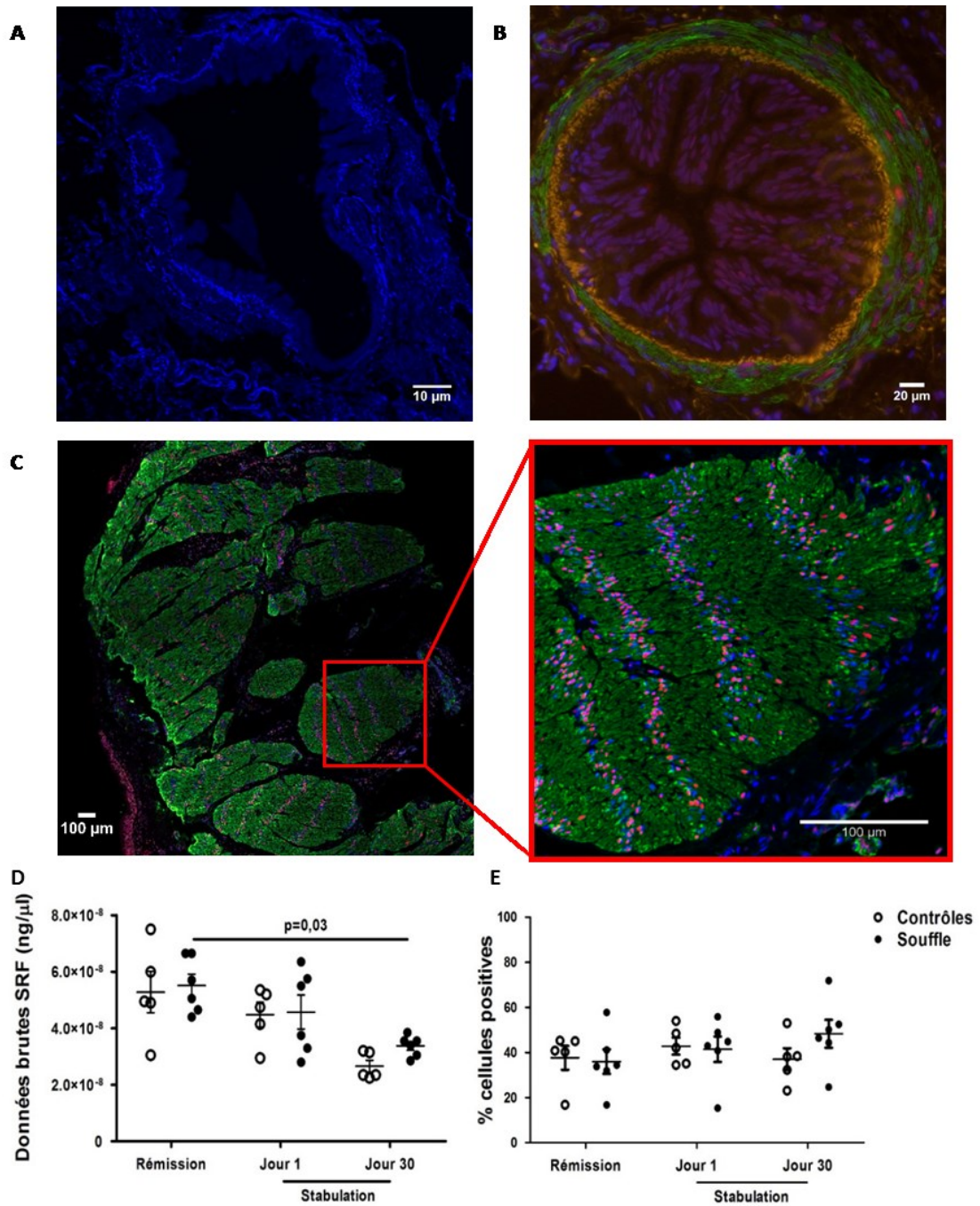


Figure 14. Expression du SRF dans les myocytes des biopsies endobronchiques. Double coloration en IF; contrôle négatif utilisant les isotypes adéquats (VP) (A); anti-SRF (rouge) et anti- α -actine (vert) (VP) (B). Biopsie endobronchique : IF (C), l'exposition antigénique induit une diminution significative de l'expression génique ($p=0,03$) chez les chevaux atteints du souffle (D), pourcentage de cellules positives au

SRF (E). Les cercles ouverts représentent les animaux contrôles, les cercles pleins représentent les chevaux atteints du souffle. VP : biopsie pulmonaire périphérique.

3.2.4 Expression Elk-1

L'expression de la protéine Elk-1 phosphorylée est stable dans les myocytes des biopsies endobronchiques peu importe le temps ou le groupe. Cependant, le niveau d'ARNm (données brutes) est significativement plus élevé ($p=0,046$) chez les chevaux atteints du souffle en comparaison avec les animaux contrôles à la fin du défi antigénique. Dans les voies périphériques, il n'y a aucune différence significative de l'expression protéique ou génique (figure 15).

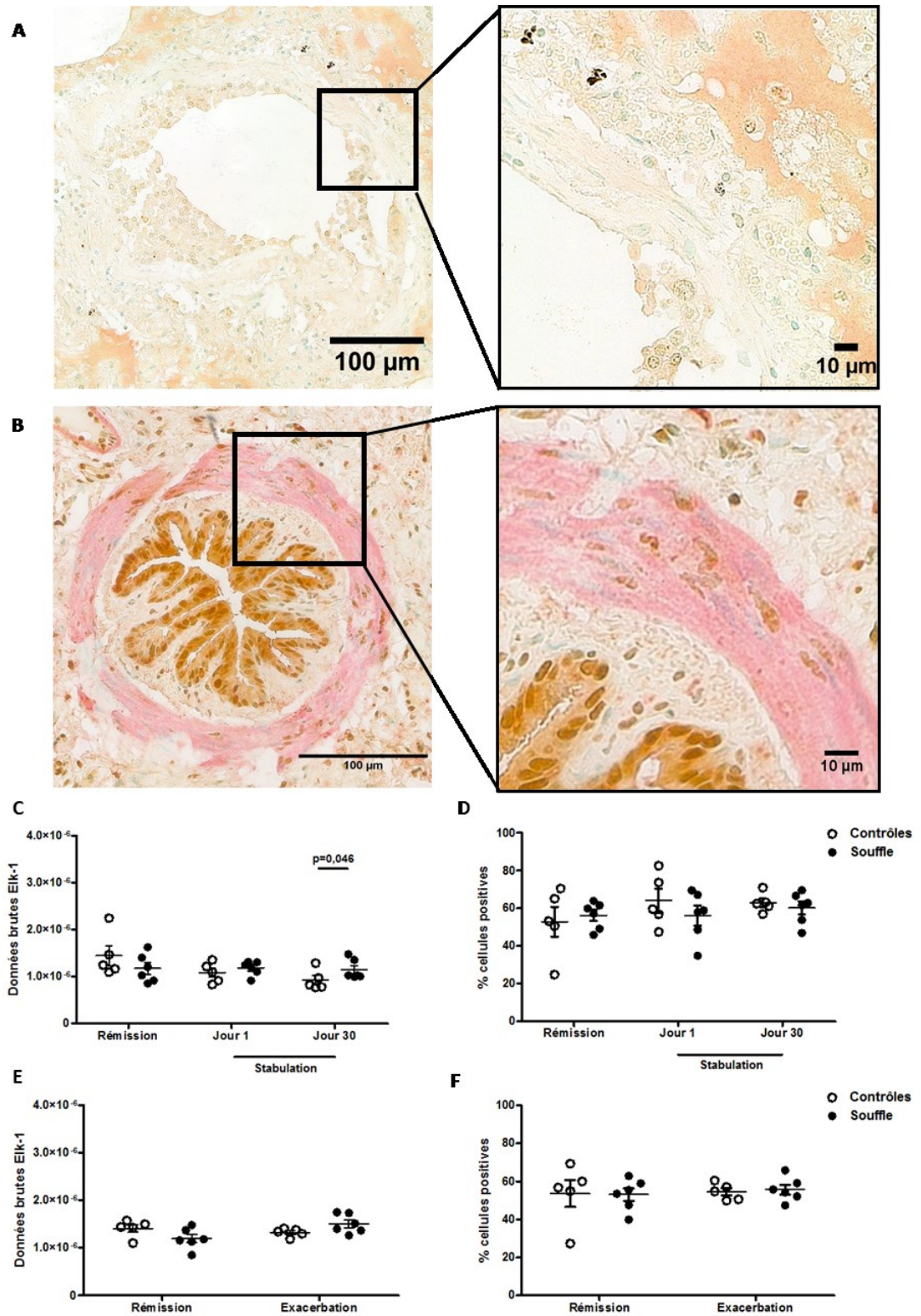


Figure 15. Expression d'Elk-1 dans les myocytes des tissus pulmonaires.

Double coloration par IHC (VP); contrôle négatif utilisant les isotypes adéquats (A); anti-pElk-1 (brun) et anti- α -actine (rose) (B); Biopsies endobronchiques; surexpression significative ($p < 0,05$) de l'expression génique brute chez les chevaux atteints du souffle comparativement aux contrôles au 30^e jour de l'exposition antigénique (C), pourcentage des myocytes exprimant pElk1 (D). VP; données brutes de l'expression génique (E) et pourcentage de myocytes positifs pour pElk-1 (F). Les cercles ouverts représentent les animaux contrôles, les cercles pleins représentent les chevaux atteints du souffle. VP : biopsie pulmonaire périphérique.

3.2.5 Expression MYOCD

Dans les biopsies endobronchiques, il n'y a aucune différence statistique entre les groupes, à aucun moment de l'étude. Dans les biopsies pulmonaires périphériques, l'exposition antigénique entraîne, chez les chevaux atteints du souffle comparativement aux animaux contrôles, une tendance à l'augmentation du pourcentage de cellules positives à la MYOCD ($p=0,05$) et une augmentation significative ($p=0,03$) de son expression génique (figure 16).

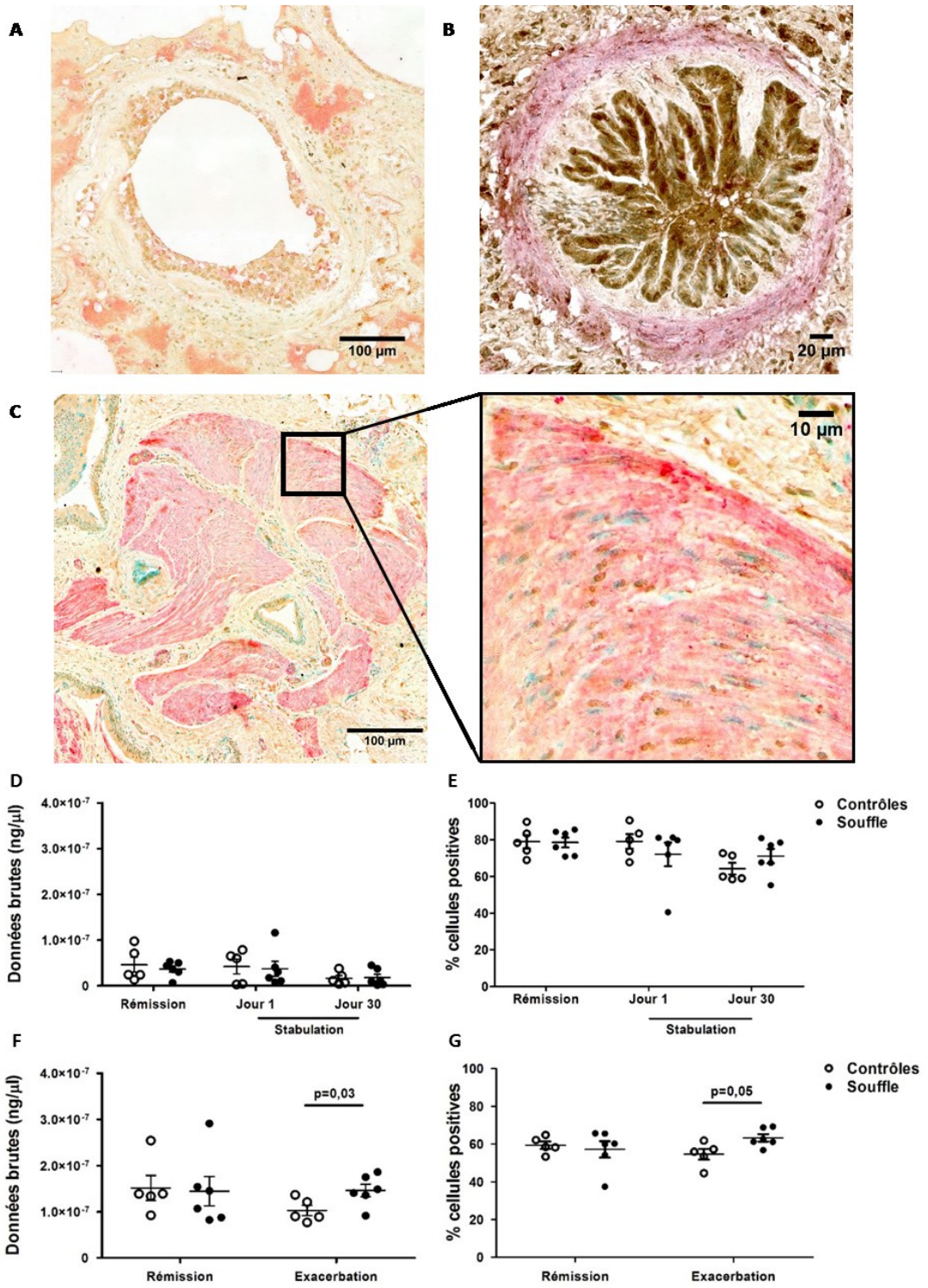


Figure 16. Expression de MYOCD dans les myocytes des tissus pulmonaires.

Double coloration par IHC, contrôle négatif utilisant les isotypes adéquats (VP) (A); anti-MYOCD (brun) et anti- α -actine (rose) (VP) (B). Biopsie endobronchique; IHC (C), données brutes de l'expression génique (D), pourcentage de myocytes exprimant la MYOCD (E). VP; chez les chevaux atteints du souffle comparativement aux chevaux contrôles à la 30^e journée de l'exposition antigénique, on note une augmentation significative ($p=0,03$) de l'expression génique brute (F) et une tendance à la surexpression de la protéine ($p=0,05$) (G). Les cercles ouverts représentent les animaux contrôles, les cercles pleins représentent les chevaux atteints du souffle. VP : biopsie pulmonaire périphérique.

3.2.6 Expression génique corrigée

Afin de corriger l'expression génique brute de chaque facteur de transcription, deux gènes de référence ont été testés dans les tissus provenant des biopsies endobronchiques : l' α -actine et la myosine totale (figure 17). La différence observée pour le SRF (figure 14C) n'existe plus lorsqu'elle est corrigée par l'un ou l'autre des gènes de référence.

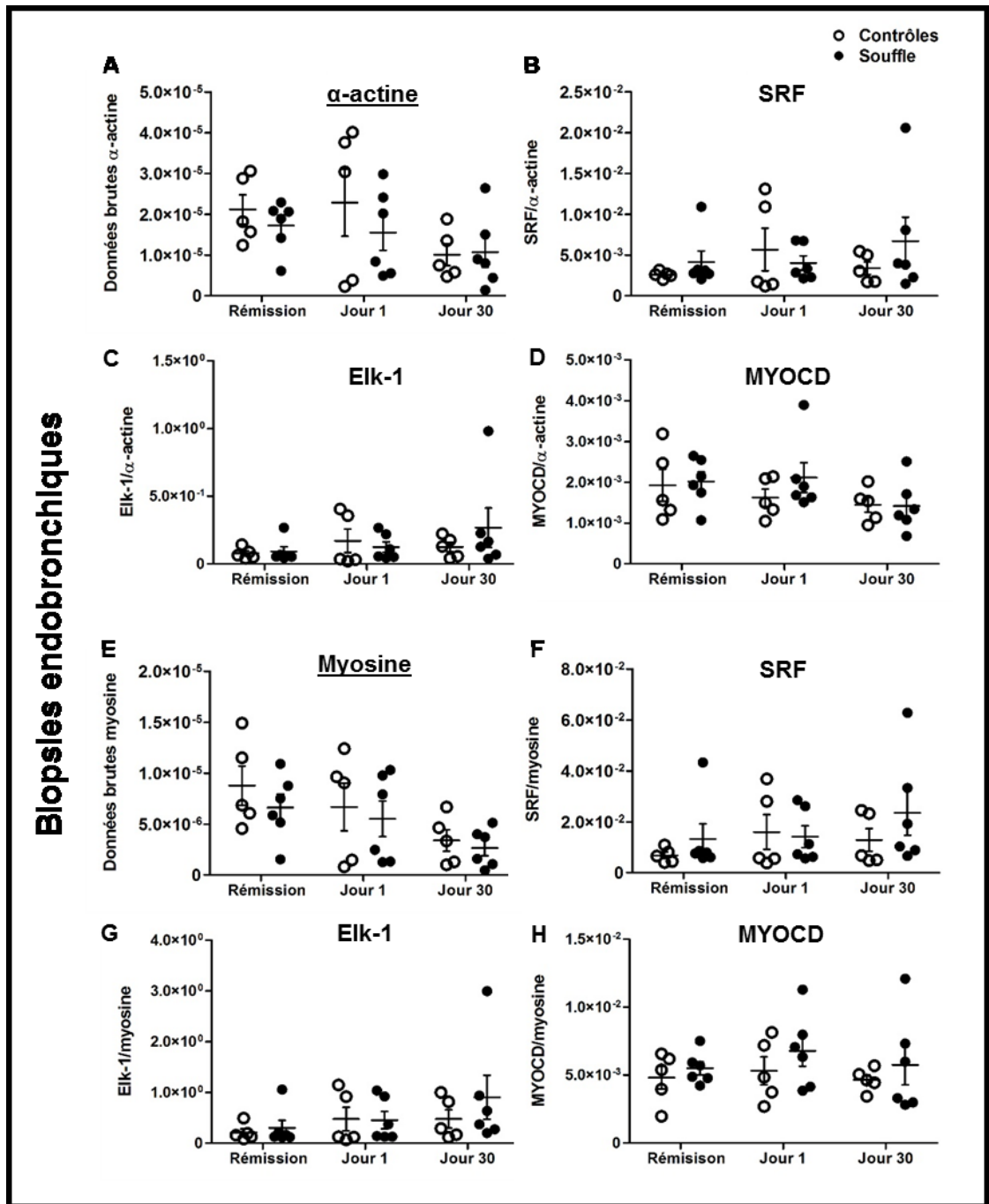


Figure 17. Biopsies endobronchiques : données géniques corrigées. Données brutes de l' α -actine (A) et de la myosine totale (E). Expression génique corrigée par l' α -actine pour SRF, Elk-1 et MYOCD (B, C, D) et par la myosine (F, G, H). Cercles ouverts : chevaux contrôles; cercles fermés : chevaux atteints du souffle.

La correction des données provenant des tissus pulmonaires périphériques a été réalisée avec un seul gène de référence : l' α -actine (figure 18) qui élimine les différences observées avec le SRF (mémoire de Karine Guérin-Montpetit, 2013) et pour la MYOCD (figure 16F).

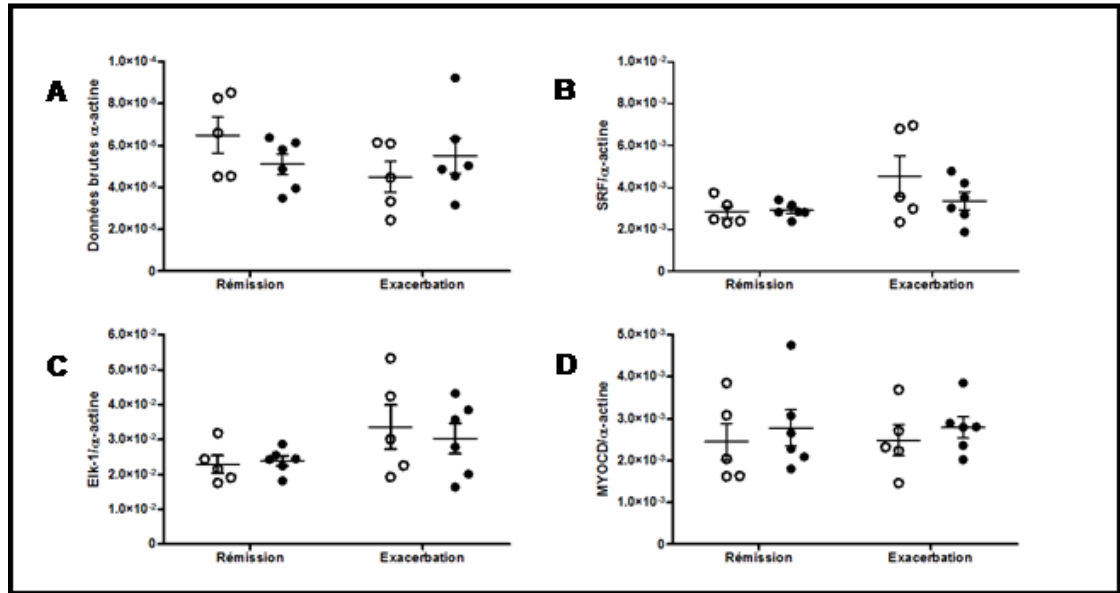


Figure 18. Biopsies pulmonaires : données géniques corrigées. Données brutes de l' α -actine (A) et données corrigées pour SRF, Elk-1, MYOCD par l' α -actine (B, C, D). Cercles ouverts : chevaux contrôles, cercles fermés, chevaux atteints du souffle.

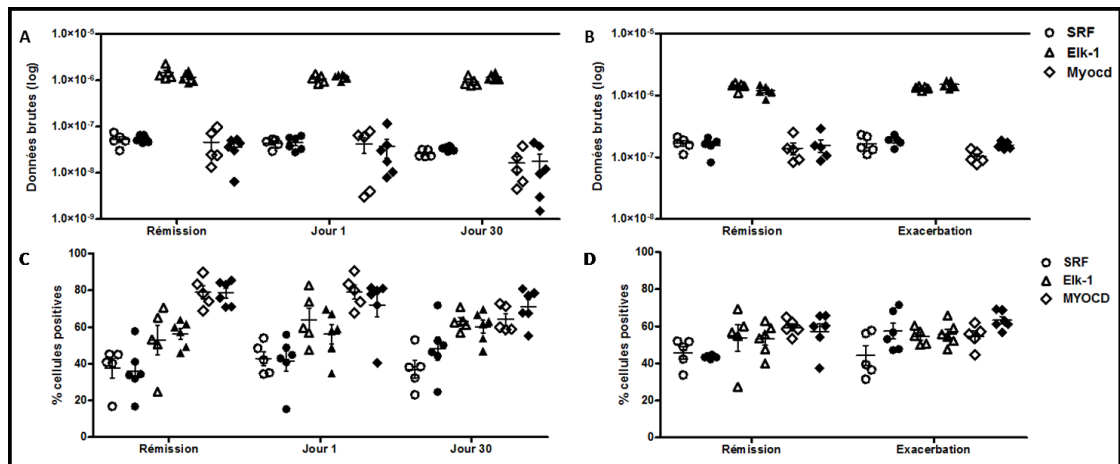


Figure 19. Comparaison entre l'expression génique et protéique.

Biopsies endobronchiques : expression génique de SRF, Elk-1, MYOCD (A); expression protéique pour SRF, pElk-1, MYOCD (C). Biopsies pulmonaires périphériques : expression génique de SRF, Elk-1, MYOCD (B), expression protéique pour SRF, pElk-1, MYOCD (D). Cercles ouverts : chevaux contrôles, cercles fermés, chevaux atteints du souffle.

4. Chapitre 4. Discussion

4.1 Expression protéique

Dans une étude antérieure, notre laboratoire a démontré que suite à une exposition antigénique de 30 jours, le pourcentage de myocytes exprimant le SRF dans les voies respiratoires périphériques des chevaux atteints du souffle est significativement plus élevé ($p=0,03$) que celui recensé chez les animaux contrôles (Mémoire Karine Guérin-Montpetit, 2013).

Comme l'augmentation de la masse de muscle lisse serait impliquée dans l'intensité des crises à travers les bronchospasmes et de l'hyperréactivité bronchique, l'identification d'une protéine impliquée dans ce phénomène pourrait devenir une cible thérapeutique importante. Néanmoins, la cause exacte de l'intensité accrue des contractions musculaires n'est pas clairement identifiée; un accroissement du nombre de cellules musculaires lisses ou un accroissement de la capacité contractile de chaque myocyte pourraient contribuer à ce phénomène. En effet, on retrouve deux phénotypes de myocytes. Ceux ayant un profil prolifératif/sécrétoire servent à augmenter le nombre de myocytes, synthétiser de la matrice extracellulaire et sécréter des facteurs de croissance ou des cytokines. Le phénotype contractile quant à lui se démarque par l'accumulation de protéines accentuant la force ou la vélocité contractile du myocyte. Chacun d'entre eux possède des gènes propres à son profil et est activé par des cofacteurs particuliers.

L'étude actuelle a démontré que tout comme le SRF, l'expression protéique de la MYOCD tend à être plus élevée ($p=0,05$) dans le groupe de chevaux atteints du souffle comparativement aux animaux contrôles. Le complexe formé du SRF et de la MYOCD étant associé à l'expression du phénotype contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (Pipes et al., 2006) et intestinales (Chen et al., 2008), il pourrait donc être responsable de l'hypertrophie observée dans les conditions asthmatiques telle que le souffle chez le cheval (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a). À notre

connaissance cette étude est la première à démontrer l'implication possible du complexe SRF-MYOCD dans le muscle lisse pulmonaire dans les conditions asthmatiques humaines ou animales.

La MYOCD est un important coactivateur du SRF et peut en modifier les gènes cibles pour ainsi favoriser le phénotype contractile. Pour ce faire, MYOCD recrute des enzymes telles que l'histone acétyltransférase p300 aux sites des gènes cibles de SRF, ce recrutement facilite la transcription de ces derniers en permettant la décondensation de la chromatine (Cao et al., 2005). Puisque la MYOCD est constitutionnellement exprimée dans le noyau, elle compte plusieurs cofacteurs ou corépresseurs qui permettent l'ajustement de son rôle suite à la signalisation extracellulaire favorisant l'un ou l'autre des phénotypes cellulaires. Par exemple, son association avec Foxo4 (Liu et al., 2005) cause une répression de la transcription des gènes de protéines contractiles en inhibant l'activité transcriptionnelle de MYOCD ou encore, la phosphorylation d'Elk-1 par une MAP kinase lui confère une meilleure affinité pour SRF et entraîne le déplacement de la MYOCD.

L'absence de variation de l'expression protéique d'Elk-1 dans les voies périphériques et centrales semble indiquer que cette protéine n'est pas impliquée dans la modulation du phénotype pour les cellules musculaires lisses respiratoires contrairement à ce qui est observé dans d'autres types de cellules musculaires lisses (Chen et al., 2008). Cependant dans ces études, on observe une modulation phénotypique vers la forme proliférative en plus de noter une diminution de l'expression des marqueurs contractiles quelques heures suivant une blessure infligée localement aux tissus. Ces faits permettent de croire que le phénotype prolifératif induit par le SRF apparaît rapidement suite à une lésion causant l'hyperplasie des cellules musculaires lisses alors que dans le souffle, une maladie asthmatique chronique, il est difficile d'établir le moment charnière auquel a débuté le remodelage ou plutôt le trauma initial.

Les myocytes des voies respiratoires de chevaux atteints du souffle démontrent des indices de prolifération accrues en comparaison à ceux des chevaux contrôles (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a). À partir de ces données et sachant que le pourcentage de cellules musculaires lisses respiratoires exprimant Elk-1 est stable dans la maladie, il semble que le phénotype prolifératif ne soit pas dirigé par le complexe ternaire formé du SRF, pElk-1 et SRE. Il existe d'autres facteurs de transcription ayant la capacité d'activer les gènes prolifératifs. Dans la même famille qu'Elk-1, Sap1 (*serum response factor accessory protein 1*) (Hassler and Richmond, 2001) et Net (Sap2) en collaboration avec Ras, Src ou Mos (Giovane et al., 1994) ont cette capacité. MKL1, un membre de la famille de MYOCD a le potentiel d'activer certains de ces gènes (Selvaraj and Prywes, 2004).

Le SRF et la MYOCD montrent une expression protéique plus élevée dans les voies périphériques chez les chevaux atteints du souffle, cette différence n'existe cependant pas dans les biopsies endobronchiques, donc dans les bronches principales. On présume donc que les voies centrales sont moins impliquées dans l'obstruction lors des crises que les voies périphériques ou que d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans le remodelage musculaire. La présence de gros cartilages dans les bronches centrales permet de croire qu'une accumulation de masse musculaire à cet endroit serait moins efficace puisque la rigidité du cartilage limiterait l'action de la contraction du muscle entourant la voie. En accord avec cette hypothèse, il a été observé chez les chevaux atteints du souffle que la masse de muscle lisse respiratoire est inversement proportionnelle au diamètre des voies (Herszberg et al., 2006; Leclere et al., 2011a), par conséquent, on observe un remodelage tissulaire accru dans les voies périphériques.

4.2 Expression génique

Nous avons également étudié l'expression génique du SRF, d'Elk-1 et de la MYOCD dans des tissus provenant de chevaux sains et atteints du souffle afin de

vérifier si une corrélation existe entre la quantité d'ARNm et le pourcentage de cellules positives pour chacune des protéines. Ces études étaient de nature exploratoire, la présence d'une corrélation avec l'expression protéique nous aurait permis d'accélérer nos découvertes sur les facteurs de transcription impliqués dans le remodelage du muscle lisse, les analyses géniques étant plus rapides que les analyses protéiques utilisées. Les données brutes obtenues après 30 jours de défi antigénique dans les voies périphériques indiquent que l'expression protéique de la MYOCD suit la même tendance que son expression génique (figure 16) alors que cette tendance n'est pas remarquée pour le SRF (voir annexe A). Toujours à 30 jours d'exposition, l'expression génique d'Elk-1 dans les bronches démontre une augmentation significative chez les chevaux atteints du souffle comparativement aux animaux contrôles, ce qu'on ne retrouve pas pour l'expression protéique (figure 15).

Dans l'étude préliminaire (figure 10A), on remarque que le patron d'expression des facteurs de transcription varie selon le type de tissu investigué. En effet, l'expression brute de MYOCD semble augmentée comparativement aux autres gènes dans le muscle isolé des bronches et de la trachée. Dans ces mêmes tissus, on constate que le niveau d'expression d'Elk-1 est remarquablement inférieur à celui de la MYOCD et de SRF alors que dans les tissus complexes (voies intermédiaires et périphériques), les niveaux d'expression sont rapprochés. Pour obtenir le muscle de la trachée et des bronches, les voies ont été disséquées ce qui résulte en une composition presque exclusive de cellules musculaires lisses alors que les voies intermédiaires et périphériques sont composées de types cellulaires mixtes (épithélium, matrice extracellulaire et autre), et donc la composition en fibres musculaires lisses se retrouve en quantité variable. Cette mixité devient importante considérant qu'Elk-1 est exprimé par plusieurs types cellulaires.

Il est plutôt rare de présenter les données brutes de l'expression génique, il est préférable d'en faire la correction par un gène de référence qui permet d'évaluer l'expression relative du gène à l'étude par rapport à cette référence qui doit être stable,

et ce malgré une condition particulière (p.ex. : la maladie du souffle). De plus, la quantification se fait sur des échantillons différents contenant une quantité de matériel étudié (p.ex. : muscle lisse) variable. Afin de normaliser l'expression des gènes à l'étude dans la maladie du souffle, une étude précédente a testé plusieurs gènes de référence (GAPDH, UBC, GUSB, B2M, PPIA, RPLP0 et RPS9) qui étaient significativement augmentés ($p < 0,05$) chez les chevaux atteints du souffle (Lavoie et al., 2012). Puisque nous étudions le muscle lisse, nous avons tenté de corriger le niveau d'expression génique par 2 marqueurs de ce type cellulaire soit l' α -actine et la myosine totale du muscle lisse (figures 17 et 18) qui génèrent des protéines contractiles exprimées dans les myocytes. Toutefois, ces gènes évoquent la quantité de muscle lisse respiratoire additionnée à celle des fibres musculaires des vaisseaux sanguins. De plus, l'expression de ces deux gènes est influencée par le SRF et la MYOCD (Wang et al., 2004) ce qui pourrait aussi contribuer à la variation observée. La correction par ces deux gènes donne des résultats non concluants puisqu'ils présentent une variation d'expression (figures 11, 17 et 18) selon le stade de la maladie ou le groupe (surrégulation ou sousrégulation).

Le SRF et l'Elk-1 sont des protéines présentes dans une multitude de types cellulaires. Afin de corriger l'expression génique de ces 2 facteurs, il faut trouver un gène qui soit aussi ubiquitaire. Cependant, comme la MYOCD est exprimée exclusivement dans les tissus musculaires lisses, l'utilisation d'un gène ubiquitaire causerait une sous-évaluation de l'expression de MYOCD dans les tissus mixtes comme ceux des voies périphériques, alors que l'utilisation d'un gène musculaire entraînerait une surévaluation de l'expression du SRF et d'Elk-1 dans les cellules de muscle isolé.

Les données géniques non corrigées sont donc difficiles à interpréter. Cependant, leur observation permet de tirer certaines conclusions. Par exemple, l'expression génique brute d'Elk-1 dans les biopsies pulmonaires et endobronchiques est supérieure à celle du SRF et de la MYOCD qui sont, quant à elle, d'un même ordre

de grandeur (figure 19). En se référant aux données préliminaires, on observe la tendance inverse dans le muscle isolé de trachée et de bronches, on peut donc comprendre qu'Elk-1 est exprimé dans plusieurs types cellulaires et que ce gène est probablement impliqué dans une multitude de processus.

En analysant l'expression protéique et génique d'Elk-1 en parallèle (figure 19), on constate que la quantité d'ARNm est supérieure à celle des autres facteurs alors que l'expression protéique est du même ordre de grandeur. Il est clair qu'Elk-1 est exprimé dans plusieurs types cellulaires et il ne faut pas négliger que le pourcentage de cellules positives est calculé de façon à retracer exclusivement la forme phosphorylée de la protéine, la forme active qui peut se lier au SRF. Ces résultats démontrent que, comme dans le cas d'Elk-1, l'expression génique peut difficilement être corrélée avec l'expression des protéines d'intérêt, car plusieurs modifications post-transcriptionnelles peuvent survenir et causer différents changements dont la fonction ou les affinités pour former des complexes protéiques (p.ex. : complexe ternaire).

5. Chapitre 5. Conclusion et perspectives

L'évaluation de l'expression protéique de la MYOCD, nous permet de croire que cette dernière pourrait être impliquée dans la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses en stimulant l'accumulation de protéines contractiles et ainsi favoriser une hypertrophie susceptible de contribuer à l'obstruction des voies respiratoires chez les chevaux atteints du souffle.

La quantification protéique d'Elk-1 suggère que cette protéine ne contribue pas toujours au maintien de l'hyperplasie rapportée dans les voies respiratoires des chevaux atteints du souffle.

La différence d'expression protéique entre les voies périphériques et centrales indique que le mécanisme à la base de l'augmentation de la masse de muscle lisse diffère selon la situation dans l'arbre bronchique. La stabilité dans l'expression protéique de SRF et de la MYOCD observée dans les voies respiratoires centrales semble indiquer une absence de l'implication de ces facteurs dans l'augmentation de la masse de muscles lisses observée à cet endroit.

Afin de confirmer l'implication du phénotype prolifératif dans l'augmentation de la masse de muscle lisse, des études futures devraient évaluer l'expression de la protéine *c-fos* produite par le gène cible du complexe ternaire formé de SRF/Elk-1/SRE. Le cas échéant, la protéine SAP-1 pourrait à son tour être évaluée puisqu'elle aurait un rôle similaire à celui d'Elk-1.

Connaissant l'implication de la MYOCD, d'éventuelles études pourraient explorer l'expression et l'implication des micro-ARN reconnus pour influencer le phénotype dans le muscle lisse vasculaire ou intestinal (Park et al., 2011; Schlesinger, 2011). Parmi eux, miR-143 et miR-145, produits lorsque le complexe SRF/MYOCD activent la transcription des gènes contractiles, favoriseraient la différenciation en

activant la MYOCD et en inhibant les facteurs associés à la prolifération (Rangrez et al., 2011). À l'opposé, miR-199a et miR-214 supprimeraient l'activation des gènes contractiles (Sanders et al., 2012).

Finalemment, des études visant l'identification des voies de signalisation en amont et en aval du complexe SRF-MYOCD pourraient également être effectuées afin de mieux comprendre ce qui gouverne la plasticité phénotypique des myocytes et, éventuellement, trouver de nouvelles cibles thérapeutiques au remodelage du muscle lisse.

Bibliographie

- Araud, T., Genolet, R., Jaquier-Gubler, P., Curran, J., 2007. Alternatively spliced isoforms of the human elk-1 mRNA within the 5' UTR: implications for ELK-1 expression. *Nucleic acids research* 35, 4649-4663.
- Aravind, L., Koonin, E.V., 2000. SAP—a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in biochemical sciences* 25, 112-114.
- Arner, A., Löfgren, M., Morano, I., 2003. Smooth, slow and smart muscle motors. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 24, 165-173.
- Black, J.L., Johnson, P.R., 2002. Factors controlling smooth muscle proliferation and airway remodelling. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2, 47-51.
- Buchwalter, G., Gross, C., Wasylyk, B., 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324, 1-14.
- Camoretti-Mercado, B., Liu, H.-W., Halayko, A.J., Forsythe, S.M., Kyle, J.W., Li, B., Fu, Y., McConville, J., Kogut, P., Vieira, J.E., 2000. Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30387-30393.
- Cao, D., Wang, Z., Zhang, C.-L., Oh, J., Xing, W., Li, S., Richardson, J.A., Wang, D.-Z., Olson, E.N., 2005. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Molecular and cellular biology* 25, 364-376.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9, 641-650.
- Carroll, N., Elliot, J., Morton, A., James, A., 1993. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *American Review of Respiratory Disease* 147, 405-410.

- Carter, P., Heinly, T., Yates, S., Lieberman, P., 1996. Asthma: the irreversible airways disease. *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 7, 566-571.
- Chai, J., Tarnawski, A., 2002. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *Journal of physiology and pharmacology* 53, 147-157.
- Chen, J., Chen, H., Sanders, K., Perrino, B., 2008. Regulation of SRF/CArG-dependent gene transcription during chronic partial obstruction of murine small intestine. *Neurogastroenterology & Motility* 20, 829-842.
- Couëtil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L., Lavoie, J.P., 2007. Inflammatory airway disease of horses. *Journal of veterinary internal medicine* 21, 356-361.
- Couëtil, L.L., Ward, M.P., 2003. Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 1645-1650.
- Du, K.L., Ip, H.S., Li, J., Chen, M., Dandre, F., Yu, W., Lu, M.M., Owens, G.K., Parmacek, M.S., 2003. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 2425-2437.
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., Nemer, M., 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *The EMBO journal* 16, 5687-5696.
- Evans, E.L., Saxton, J., Shelton, S.J., Begitt, A., Holliday, N.D., Hipskind, R.A., Shaw, P.E., 2011. Dimer formation and conformational flexibility ensure cytoplasmic stability and nuclear accumulation of Elk-1. *Nucleic acids research* 39, 6390-6402.
- Franchini, M., Gill, U., Fellenberg, R.v., Bracher, V.D., 2000. Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay. *American journal of veterinary research* 61, 1369-1374.

- Gerber, V., King, M., Schneider, D., Robinson, N., 2000. Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction. *Equine veterinary journal* 32, 411-417.
- Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S.-M., Sobieszczuk, P., Wasyluk, B., 1994. Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes & development* 8, 1502-1513.
- Glynn, A., Michaels, L., 1960. Bronchial biopsy in chronic bronchitis and asthma. *Thorax* 15, 142-153.
- Halayko, A.J., Salari, H., MA, X., Stephens, N.L., 1996. Markers of airway smooth muscle cell phenotype. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 270, L1040-L1051.
- Hassler, M., Richmond, T.J., 2001. The B-box dominates SAP-1–SRF interactions in the structure of the ternary complex. *The EMBO journal* 20, 3018-3028.
- Herszberg, B., Ramos-Barbón, D., Tamaoka, M., Martin, J.G., Lavoie, J.-P., 2006. Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *Journal of allergy and clinical immunology* 118, 382-388.
- Hill, C.S., Wynne, J., Treisman, R., 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
- Hirota, J.A., Nguyen, T.T., Schaafsma, D., Sharma, P., Tran, T., 2009. Airway smooth muscle in asthma: phenotype plasticity and function. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 22, 370-378.
- Hirschi, K.K., Majesky, M.W., 2004. Smooth muscle stem cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 276, 22-33.
- Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., Schwartz, J., 1998. Growth Hormone Stimulates Phosphorylation and Activation of Elk-1 and Expression of c-fos, egr-1, and junB through Activation of Extracellular Signal-regulated Kinases 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31327-31336.

- Holgate, S.T., Davies, D.E., Lackie, P.M., Wilson, S.J., Puddicombe, S.M., Lordan, J.L., 2000. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma. *Journal of allergy and clinical immunology* 105, 193-204.
- Hotchkiss, J., Reid, S., Christley, R., 2007. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine veterinary journal* 39, 301-308.
- Howarth, P.H., Knox, A.J., Amrani, Y., Tliba, O., Panettieri Jr, R.A., Johnson, M., 2004. Synthetic responses in airway smooth muscle. *Journal of allergy and clinical immunology* 114, S32-S50.
- Imamura, M., Long, X., Nanda, V., Miano, J.M., 2010. Expression and functional activity of four myocardin isoforms. *Gene* 464, 1-10.
- James, A.L., Bai, T.R., Mauad, T., Abramson, M.J., Dolhnikoff, M., McKay, K.O., Maxwell, P.S., Elliot, J.G., Green, F.H., 2009. Airway smooth muscle thickness in asthma is related to severity but not duration of asthma. *European Respiratory Journal* 34, 1040-1045.
- Janknecht, R., Nordheim, A., 1992. Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 20, 3317-3324.
- Jean, D., Vrins, A., Beauchamp, G., Lavoie, J.-P., 2011. Evaluation of variations in bronchoalveolar lavage fluid in horses with recurrent airway obstruction. *American journal of veterinary research* 72, 838-842.
- Johansen, F.-E., Prywes, R., 1993. Identification of transcriptional activation and inhibitory domains in serum response factor (SRF) by using GAL4-SRF constructs. *Mol Cell Biol* 13, 4640-4647.
- Karim, F., Urness, L., Thummel, C., Klemsz, M., McKercher, S., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R., Gunther, C., Nye, J., 1990. The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes & development* 4, 1451-1453.
- Kemp, P., Metcalfe, J., 2000. Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochemical Journal* 345, 445-451.

- Koterba, A.M., Kosch, P.C., Beech, J., Whitlock, T., 1988. Breathing strategy of the adult horse (*Equus caballus*) at rest. *Journal of applied physiology* 64, 337-346.
- Kuwahara, K., Barrientos, T., Pipes, G.T., Li, S., Olson, E.N., 2005. Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Mol Cell Biol* 25, 3173-3181.
- Latchman, D.S., 1993. Transcription factors: an overview. *International journal of experimental pathology* 74, 417.
- Latchman, D.S., 1997. Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 1305-1312.
- Latinkic, B.V., Zeremski, M., Lau, L.F., 1996. Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic acids research* 24, 1345-1351.
- Lavoie, J.-P., Lefebvre-Lavoie, J., Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Chamberland, A., Laprise, C., Lussier, J., 2012. Profiling of differentially expressed genes using suppression subtractive hybridization in an equine model of chronic asthma. *PloS one* 7, e29440.
- 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., G elinas-Lymburner,  .., 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., Lavoie, J.-P., 2011b. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* 16, 1027-1046.
- Lee, S.-M., Vasishtha, M., Prywes, R., 2010. Activation and repression of cellular immediate early genes by serum response factor cofactors. *Journal of Biological Chemistry* 285, 22036-22049.

- Léguillette, R., 2003. Recurrent airway obstruction—heaves. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 19, 63-86.
- Li, R., Pei, H., Watson, D.K., 2000. Regulation of Ets function by protein-protein interactions. *Oncogene* 19, 6514-6523.
- Ling, Y., Lakey, J.H., Roberts, C.E., Sharrocks, A.D., 1997. Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *The EMBO journal* 16, 2431-2440.
- 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., 2003. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 39-47.
- Liu, Y., Shepherd, E.G., Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology* 7, 202-212.
- Liu, Z.-P., Wang, Z., Yanagisawa, H., Olson, E.N., 2005. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Developmental cell* 9, 261-270.
- Mack, C.P., Hinson, J.S., 2005. Regulation of smooth muscle differentiation by the myocardin family of serum response factor co-factors. *J Thromb Haemost* 3, 1976-1984.
- Marti, E., Gerber, H., Essich, G., Oulehla, J., Lazary, S., 1991. The genetic basis of equine allergic diseases 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine veterinary journal* 23, 457-460.
- Megeney, L.A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J.E., Rudnicki, M.A., 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & development* 10, 1173-1183.
- Mitchell, P.J., Tjian, R., 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Miyamoto, M., Prause, O., Sjöstrand, M., Laan, M., Lötvall, J., Lindén, A., 2003. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *The Journal of Immunology* 170, 4665-4672.

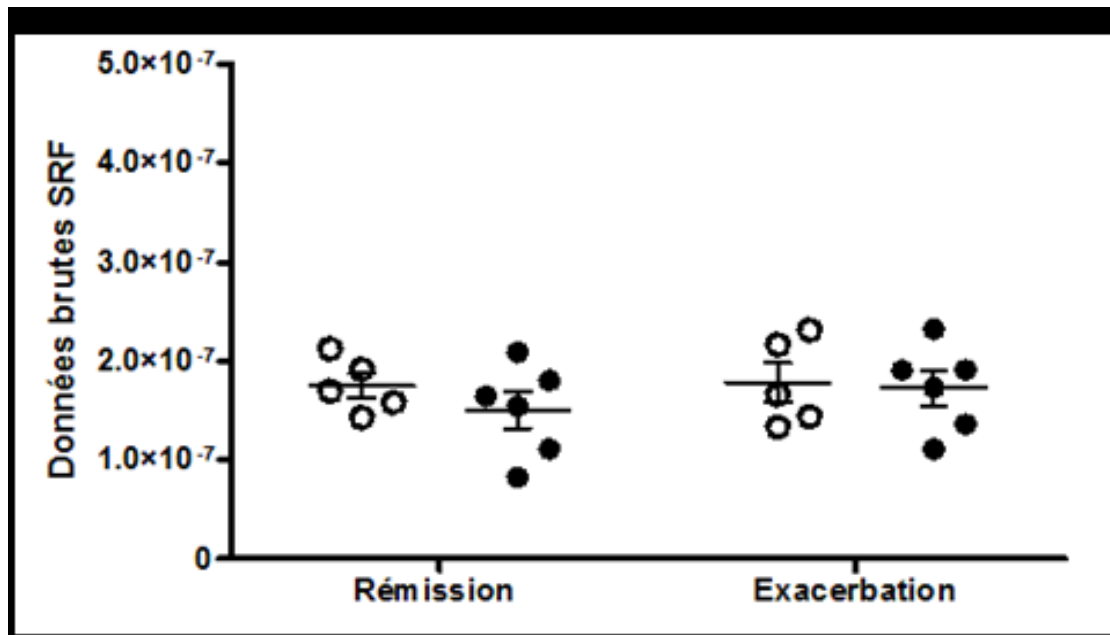
- Murphy, D.M., Oâ, P.M., 2010. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *CHEST Journal* 137, 1417-1426.
- Murphy, R., Walker, J., Strauss, J., 1997. Myosin isoforms and functional diversity in vertebrate smooth muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 117, 51-60.
- Nakagome, K., Nagata, M., 2011. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. *Auris Nasus Larynx* 38, 555-563.
- Naylor, B., 1962. The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. *Thorax* 17, 69-72.
- Nelson, H.S., Davies, D.E., Wicks, J., Powell, R.M., Puddicombe, S.M., Holgate, S.T., 2003. Airway remodeling in asthma: new insights. *Journal of allergy and clinical immunology* 111, 215-225.
- Nocker, R.E., Out, T.A., Weller, F.R., Mul, E.P., Jansen, H.M., van der Zee, J.S., 1999. Influx of neutrophils into the airway lumen at 4 h after segmental allergen challenge in asthma. *International archives of allergy and immunology* 119, 45-53.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., Treisman, R., 1988. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-< i> fos</i> serum response element. *Cell* 55, 989-1003.
- Olszewski, M.A., Zhang, X.-Y., Robinson, N.E., 1999. Pre-and postjunctional effects of inflammatory mediators in horse airways. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 277, L327-L333.
- Owens, G.K., 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews* 75, 487-517.
- Park, C., Hennig, G.W., Sanders, K.M., Cho, J.H., Hatton, W.J., Redelman, D., Park, J.K., Ward, S.M., Miano, J.M., Yan, W., 2011. Serum Response Factor–Dependent MicroRNAs Regulate Gastrointestinal Smooth Muscle Cell Phenotypes. *Gastroenterology* 141, 164-175.

- Parmacek, M.S., 2007. Myocardin-Related Transcription Factors Critical Coactivators Regulating Cardiovascular Development and Adaptation. *Circulation Research* 100, 633-644.
- Pauwels, R.A., Buist, A.S., Calverley, P.M., Jenkins, C.R., Hurd, S.S., 2012. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 163.
- Pipes, G.T., Creemers, E.E., Olson, E.N., 2006. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes & development* 20, 1545-1556.
- Rangrez, A.Y., Massy, Z.A., Metzinger-Le Meuth, V., Metzinger, L., 2011. miR-143 and miR-145 Molecular Keys to Switch the Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 4, 197-205.
- Rao, V.N., Reddy, E.S., 1993. Delta elk-1, a variant of elk-1, fails to interact with the serum response factor and binds to DNA with modulated specificity. *Cancer Res* 53, 215-220.
- Relave, F., David, F., Leclere, M., Alexander, K., Bussieres, G., Lavoie, J.P., Marcoux, M., 2008. Evaluation of a thoracoscopic technique using ligating loops to obtain large lung biopsies in standing healthy and heaves-affected horses. *Veterinary Surgery* 37, 232-240.
- Salinas, S., Hipskind, R.A., 2005. SUMO pins Elk-1 in the nucleus]. *Médecine sciences: M/S* 21, 121.
- Sanders, K.M., Koh, S.D., Ro, S., Ward, S.M., 2012. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9, 633-645.
- Schlesinger, J. 2011. Regulation of Cardiac Gene Expression by Transcriptional and Epigenetic Mechanisms and Identification of a Novel Chromatin Remodeling Factor. Freie Universität Berlin.

- Selvaraj, A., Prywes, R., 2004. Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC molecular biology* 5, 13.
- Sharrocks, A.D., Brown, A.L., Ling, Y., Yates, P.R., 1997. The ETS-domain transcription factor family. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29, 1371-1387.
- Shaw, P.E., Saxton, J., 2003. Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 1210-1226.
- Shore, P., Sharrocks, A.D., 1994. The transcription factors Elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of Elk-1. *Mol Cell Biol* 14, 3283-3291.
- Siddiqui, S., Martin, J.G., 2008. Structural aspects of airway remodeling in asthma. *Current allergy and asthma reports* 8, 540-547.
- Smith, H., 1992. Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clinical & Experimental Allergy* 22, 187-197.
- Swinburne, J.E., Bogle, H., Klukowska-Rötzler, J., Drögemüller, 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. *Mammalian Genome* 20, 504-515.
- Vanhoutte, P., Nissen, J.L., Brugg, B., Della Gaspera, B., Besson, M.-J., Hipkind, R.A., Caboche, J., 2001. Opposing roles of Elk-1 and its brain-specific isoform, short Elk-1, in nerve growth factor-induced PC12 differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 5189-5196.
- Vickers, E.R., Kasza, A., Kurnaz, I.A., Seifert, A., Zeef, L.A., O'Donnell, A., Hayes, A., Sharrocks, A.D., 2004. Ternary complex factor-serum response factor complex-regulated gene activity is required for cellular proliferation and inhibition of apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 24, 10340-10351.

- Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., Olson, E.N., 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862.
- Wang, D.Z., Li, S., Hockemeyer, D., Sutherland, L., Wang, Z., Schratt, G., Richardson, J.A., Nordheim, A., Olson, E.N., 2002. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14855-14860.
- Wang, Z., Wang, D.-Z., Hockemeyer, D., McAnally, J., Nordheim, A., Olson, E.N., 2004. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428, 185-189.
- West, A.G., Shore, P., Sharrocks, A.D., 1997. DNA binding by MADS-box transcription factors: a molecular mechanism for differential DNA bending. *Mol Cell Biol* 17, 2876-2887.
- West, J.B., 2012. *Respiratory physiology: the essentials*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Yang, S.-H., Jaffray, E., Senthinathan, B., Hay, R.T., Sharrocks, A.D., 2003. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell Cycle* 2, 528-530.
- Yang, S.-H., Shore, P., Willingham, N., Lakey, J.H., Sharrocks, A.D., 1999. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *The EMBO journal* 18, 5666-5674.

Annexe A

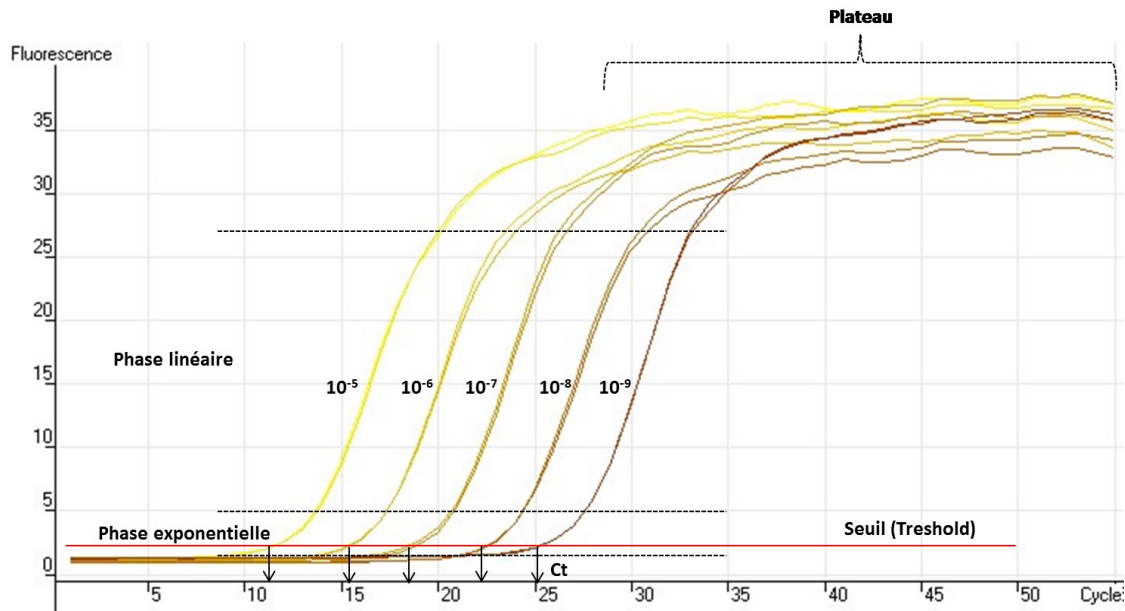


Annexe A1. Expression génique brute de SRF dans les biopsies pulmonaires périphériques.

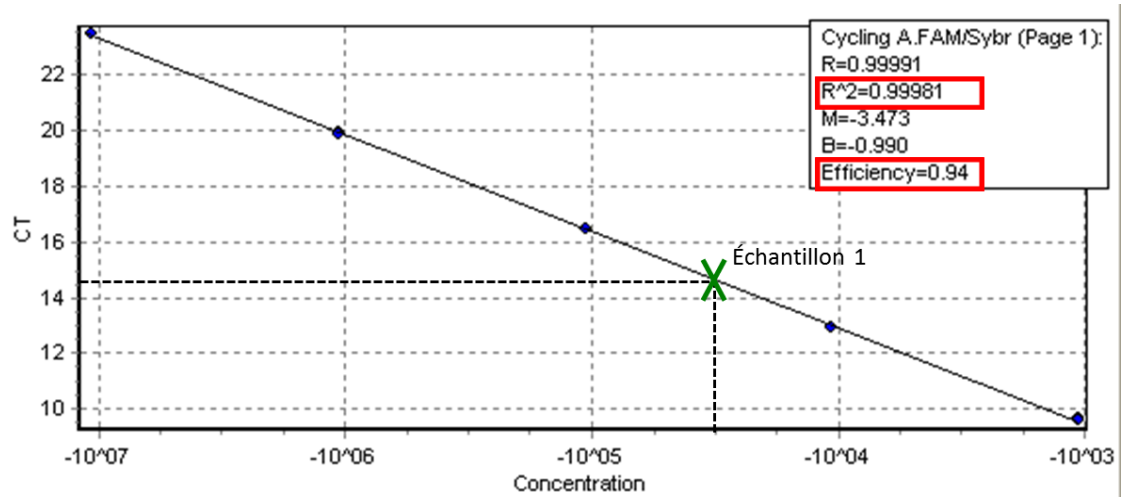
Cercles ouverts : chevaux contrôles, cercles fermés, chevaux atteints du souffle.

Annexe B

Calcul de la courbe standard



Annexe B1. La partie inférieure entre les 2 lignes pointillées est la phase exponentielle de l'amplification. La partie supérieure entre les 2 lignes pointillées est la phase linéaire de l'amplification. La partie en haut du graphique montre le plateau qu'atteint la fluorescence. On voit les courbes en duplicata des 5 dilutions utilisées pour obtenir la courbe standard. La concentration initiale de l'amplicon est de 9,38 ng/μl. La ligne rouge représente le seuil établi qui sera ensuite utilisé pour la PCR de l'échantillon à évaluer. Les 5 flèches représentent les Ct respectifs pour chaque dilution qui permettra d'établir la fonction de droite d'étalonnage.



Annexe B2. Une bonne corrélation linéaire (R^2) doit être supérieure à 0,999 et une efficacité supérieure à 90% (0,90) est acceptable. Le X vert montre le résultat (C_t) obtenu pour l'échantillon à évaluer qui permet de trouver sa concentration.

Annexe C : Protocoles IF pour le SRF

Solutions et réactifs

NOTE: Les solutions doivent être préparées avec de l'eau Milipore

1. 10X Saline de Phosphate tamponnée (PBS):

Pour préparer 1 L, ajouter :

80 g de chlorure de sodium (NaCl),

2 g de chlorure de potassium (KCl),

14.4 g de phosphate de sodium dibasique (Na₂HPO₄) et

2.4 g de phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄) à 1L d'H₂O.

Ajuster le pH à 7.4.

2. Tampon de blocage:

Pour préparer 25 mL, ajouter :

2.5 mL 10X PBS,

1.25 mL de sérum normal (même espèce que l'anticorps secondaire)

21.25 mL d'H₂O. Bien mélanger.

En mélangeant, ajouter 75 µL de Triton X-100 (100%).

3. Tampon de blocage sans sérum:

Pour préparer 25 mL, ajouter :

2.5 mL 10X PBS,

22.425 mL d'H₂O, mélanger.

En mélangeant, ajouter 75 µL Triton X-100 (100%).

4. Tampon 10 mM Citrate de Sodium:

Pour préparer 1L, ajouter :

2.94 g de sel trisodium citrate de sodium dihydrate (C₆H₅Na₃O₇•2H₂O)

900 mL d'H₂O.

Ajuster le pH à 6.0.

Compléter avec ddH₂O

5. 1X PBS, salé (0.4M) (high salt PBS):

Pour préparer 1 L, ajouter :

100 mL de PBS 10X

à 900 mL d'H₂O.

Ajouter 23.38 g de NaCl et mélanger.

6. Solution de Dapi : bien mélanger :

1 µl Dapi (5 mg/mL dans le congélateur -20°C) dans

10 mL PBS 1x

7. Solution de montage :

Dissoudre 0,4 g gélatine dans
 16,6 mL ddH₂O
 1,4mL PBS 10x
 6 mL glycérol
 0,02 g azide sodium juste avant l'utilisation

8. Anticorps secondaires conjugués à des fluorochromes (**1 :1000**)
- Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG Higly cross-absorbed (A11037)
 - Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG Higly cross-absorbed (A11029)
- NOTE:** Lors de l'usage d'un anticorps, primaire ou secondaire, pour la première fois, titrer l'anticorps pour déterminer la dilution optimale offrant un signal le plus fort avec le moins de background pour un échantillon donné.
9. Anticorps primaires
- Anticorps polyclonal de lapin anti-SRF d'origine humaine, Santa Cruz (SC-335), lot#D1709, **1:250**
 - Anticorps monoclonal de souris anti-actin α smooth-muscle clone 1A4, fluide d'ascite, Sigma (A2547), **1:250**

Procédures

Déparaffination/Réhydratation:

2x Xylène 5 min
 1x EtOH 100% 10 min.
 1x EtOH 95% 10 min
 1x EtOH 70% 10 min
 2x PBS 5 min

Démasquage d'antigènes:

1. Placer les lames dans la solution tampon de citrate de sodium à T°p.
2. Bain-marie 30min à 500°.
3. Refroidir 15min sur la paillasse.
4. 3x ddH₂O 5min.
5. 1x PBS 5min.

Immunomarquage

1. Sortir une lame à la fois du bain de PBS. Secouer l'excès de liquide.
2. Encercler les sections de tissu avec un crayon hydrophobique.
3. Dans une boîte humide, appliquer le Tampon de Blocage avec Sérum.
4. Incuber 60min.
5. Préparation de Ac1 (SRF) avec la solution de Blocage avec Sérum.

6. Incuber «overnight» à 4°C.
 7. 2x PBS 1x 2 min
 1x PBS High salt 2 min
 1x PBS 1x 2 min
 8. Retirer l'excès de liquide.
 9. Appliquer la solution diluée d'anticorps primaire α -actin.
 10. Incuber 60min à T°p.
 11. 2x PBS 1x 2 min
 1x PBS High salt 2 min
 1x PBS 1x 2 min
 12. Incuber les lames avec la solution d'anticorps secondaire dans la solution de Blocage sans sérum pour 60 min à T°p.
- NOTE: double marquage, préparer un cocktail d'anticorps secondaires à la dilution appropriée dans la solution de Blocage sans Sérum.**
13. 2x PBS 1x 2 min
 1x PBS High salt 2 min
 1x PBS 1x 2 min
 14. Retirer l'excès de liquide.
 15. Appliquer la solution de Dapi 5 min.
 16. 2x PBS 1x 5 min
 17. Montage des lames :
 un grosse goutte de sln de montage (20 μ l)
 Déposer une lamelle, retirer les bulles.

Annexe D : Protocole Extraction d'ARN total avec le phénol/chloroforme

Matériel :

- Solution TRIzol® (Invitrogen, #15596-018)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, #I9516)
- Chloroforme (Sigma-Aldrich, #25668)
- Éthanol 75%
- Solution de décontamination pour les nucléases (Integrated DNATechnologies, #11-05-01-01)
- Eau distillée ultrapure (Invitrogen, #10977-023)
- Tubes stériles 1,5 mL polypropylène
- Tubes coniques stériles 10 mL polypropylène
- Homogénéisateur (Qiagen, #9001271)
- Sondes jetables (Qiagen, #990890)
- Centrifugeuse (Eppendorf, 5424 R)
- Balance
- Travailler en conditions aseptiques

Protocole

1. Peser 100 mg de tissus et les déposer dans les tubes coniques stériles de 10 mL contenant 1 mL de solution TRIzol® et laisser les tubes sur glace.
2. Homogénéiser les tissus environ 30 secondes en changeant la sonde entre chaque échantillon.
3. Incuber à température pièce pendant 5 minutes, puis transférer l'homogénat dans des tubes stériles de 1,5 mL.
4. Ajouter 200 µL de chloroforme à chaque échantillon et agiter 30 secondes par inversion. Incuber à température pièce pendant 5 minutes.

5. Centrifuger à 11 000 g pour 15 minutes à 4 °C. Pendant la centrifugation, préparer des tubes stériles de 1,5 mL contenant 500 µL d'isopropanol. Laisser les tubes sur glace.
6. Récupérer la phase aqueuse de chaque échantillon et la transférer dans les tubes d'isopropanol. Vortexer quelques secondes.
7. Incuber à -20 °C toute la nuit pour précipiter l'ARN.
8. Centrifuger à 11 000 g pour 10 minutes à 4 °C.
9. Retirer le surnageant par inversion ou par pipetage.
10. Ajouter 1 mL d'éthanol 75% au culot et mélanger par inversion.
11. Centrifuger à 7 500 g pour 5 minutes à 4°C.
12. Répéter les étapes 9, 10 et 11 pour un 2^e lavage. Retirer le surnageant par inversion ou pipetage.
13. Laisser sécher les culots à l'air.
14. Resuspendre les culots dans un volume d'eau distillée ultrapure afin d'obtenir une concentration d'environ 0,7-0,9 µg/µL d'ARN.
15. Quantifier l'ARN selon la méthode désirée.
16. Entreposer l'ARN à -80 °C.

Annexe E : Protocole pour l'extraction d'ARN sur la colonne de biopsies endobronchiques

Matériel :

- Kit d'extraction RNeasy Mini kit (Qiagen, #74106)
- Tubes coniques stériles 10 mL polypropylène
- Homogénéisateur (Qiagen, #9001271)
- Sondes jetables (Qiagen, #990890)
- β -mercaptoéthanol (Sigma-aldrich, #M6250)
- Éthanol 96-100%
- Éthanol 70%
- Eau distillée ultrapure (Invitrogen, #10977-023)
- Tubes stériles 1,5 mL polypropylène
- Centrifugeuse (Eppendorf, 5424 R)
- Travailler en conditions aseptiques

Protocole

Ajouter 44mL d'éthanol 96-100% au tampon RPE si le kit est neuf

1. Mettre les biopsies endobronchiques dans des tubes stériles de 10 mL contenant 600 μ L de solution RLT et 6 μ L de β -mercaptoéthanol.
2. Homogénéiser les tissus environ 30 secondes en changeant la sonde entre chaque échantillon.
3. Transférer les homogénats dans des tubes stériles de 1,5 mL et centrifuger 3 minutes à 14 000 rpm.
4. Récupérer le surnageant et mélanger à 1 volume d'éthanol 70%.
5. Transférer sur une colonne et centrifuger 15 secondes à 11 000 rpm.
6. Jeter le liquide et ajouter 700 μ L de tampon RW1 à la colonne. Centrifuger 15 secondes à 11 000 rpm.

7. Jeter le liquide et ajouter 500 μ L de tampon RPE à la colonne. Centrifuger 15 secondes à 11 000 rpm.
8. Jeter le liquide et ajouter 500 μ L de tampon RPE à la colonne. Centrifuger 2 minutes à 11 000 rpm.
9. Jeter le liquide et centrifuger la colonne à 14 000 rpm pendant 1 minute pour sécher le filtre.
10. Placer la colonne sur un tube stérile 1,5 mL et ajouter 30 μ L d'eau distillée ultrapure centre du filtre. Centrifuger à 11 000 rpm pendant 1 minute pour éluer l'ARN.
11. Doser l'ARN avec la méthode désirée.
12. Entreposer l'ARN à -80 °C

Annexe F : Protocole de purification de la transcription inverse

Matériel :

- Kit de purification (Macherey-Nagel, #740609)
- Eau distillée ultrapure (Invitrogen, #10977-023)
- Tubes stériles 1,5 mL polypropylène
- Centrifugeuse (Eppendorf, 5424 R)
- Bloc chauffant (optionnel)

Protocole

1. Ajuster si nécessaire le volume de la RT à 50 μ L avec de l'eau distillée ultrapure.
2. Ajouter 2 volumes de tampon NT1, mélanger et déposer sur une colonne.
3. Centrifuger à 11 000g pendant 30 secondes. Jeter le liquide.
4. Ajouter 700 μ L de tampon NT3 et centrifuger 11 000 g pendant 30 secondes. Jeter le liquide. Répéter 1 fois.
5. Centrifuger la colonne à 11 000g pendant 1 minute pour sécher le filtre.
6. Sécher le filtre en incubant la colonne à 70 °C pendant 5 minutes (optionnel).
7. Ajouter 30 μ L d'eau distillée ultrapure au centre du filtre et incuber à température de la pièce pour 1minute.
8. Centrifuger à 11 000g pour 1 minute. Jeter la colonne.
9. Entreposer le cDNA à -20 °C.

Annexe G : Protocole pour la transcription inverse

Matériel :

- Solution de décontamination pour les nucléases (Integrated DNATechnologies, #11-05-01-01)
- Eau distillée ultrapure (Invitrogen, #10977-023)
- Tubes stériles 0,5 mL polypropylène
- Solution de déoxynucléotides à 10 mM (Invitrogen, #10297-018)
- Solution d'amorces oligo(dt)₁₂₋₁₈ à 50 µM (Invitrogen, # 18418012)
- Enzyme de transcription inverse Superscript III (200U/µl) (Invitrogen, #18080-044)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, #18080-044)
- Tampon de stabilisation 5X (Invitrogen, #18080-044)
- Inhibiteur de ribonucléase RNasin (Promega, #N211B)
- Bloc chauffant
- Travailler en conditions aseptiques

Protocole

1. Préchauffer le bloc à 65 °C.
2. Faire le mélange suivant : (1µl oligo_(dt)+ 1µl dNTP) x le nombre d'échantillons.
Réserver sur glace.
3. Pour chaque échantillon, mélanger 1µg d'ARN et 2µl du mélange fait à l'étape 1.
Compléter le volume à 13 µl avec de l'eau ultrapure.
4. Incuber à 65 °C pour 5minutes et mettre sur glace pour au moins 1 minute.
5. Faire le mélange suivant : (4 µl tampon 5X + 1 µl DTT + 1 µl RNasin + 1µl Superscript III) x le nombre d'échantillons.
6. Faire une brève centrifugation des échantillons et ajouter 7 µl du mélange fait à l'étape et mélanger par up and down doucement.
7. Incuber à 50 °C pour 30-60 minutes. Lorsque l'incubation est terminée, on peut mettre les tubes à -20 °C le temps que le bloc chauffant atteigne 70 °C pour l'étape 8.

8. Inactiver la réaction par une incubation à 70 °C pour 15 minutes.
9. Entreposer les cDNA à -20 °C.

Annexe H : Protocoles pour l'IHC

Matériel

Équipement

- Balance
- pH-mètre
- Cylindres gradués
- Cruche 10l
- Plaque agitatrice
- Bâtons aimantés
- Pipettes pasteur/poire
- Pipettes en plastique 1mL
- Pipettes 10mL, 25mL
- Pipettes p1000, p200, p10, p2,5, tips
- Bacs avec couvercle et support à lames et crochet
- Plaque chauffante
- Bac en métal large
- Presto
- Tubes 2mL, 12mL, 15mL
- Papier d'aluminium
- Entonnoir
- Filtre en papier
- Wet box
- Étuve
- Chronomètre
- Pincés
- Lamelles

Produits chimiques

- Xylène (sigma Aldrich)
- Éthanol 100%
- Éthanol 95%
- Éthanol 80%
- H₂O millipore
- dH₂O
- Peroxyde d'hydrogène 30%
- EDTA liquide
- Biotin blocking system (Dako X0590)
- Chlorure de sodium, NaCl (Fisher S271-2)
- Triton X-100
- Chlorure de potassium, KCl
- Phosphate de sodium dibasique, Na₂HPO₄ (Sigma S3397)
- Trizma (Sigma T6066)
- Glycine
- Acide acétique, CH₃COOH
- Phosphate de potassium monobasique, KH₂PO₄
- Glycine
- Citrate de trisodium dihydrate, C₆H₅Na₃O₇•2H₂O
- Acide chloridrique concentré, HCL 16M
- Hydroxyde de sodium concentré, NaOH 5M
- Acétone, C₃H₆O

- dH₂O
- Permount
- MethylGreen (Vector Labs H-3402)
- VECTOR Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (vector Labs SK-5100)
- Vectastain ABC Elite kit (Vector Labs PK-6100)
- Vectastain ABC-AP kit (Vector Labs AK-5000)
- DAB peroxydase substrate kit, 3'3'-diaminobenzidine (Vector Labs SK-4100)
- Levamisole
- Tween-20
- Crayon hydrophobique
- Sérum de chèvre (Vector Labs S-1000)
- Sérum d'âne (JIRL 017-000-121)
- Polyclonal antibody to myocardin (Covalab pab0604)
- Rabbit polyclonal to ELK-1(phospho S383) (AbCam ab32799)
- Mouse anti-actin α -smooth muscle IgG2a (Sigma A2547)
- Biotin goat anti-mouse Ig (BD Pharmingen 550337)
- Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Biotin antibody produced in goat(Sigma B8895)
- Biotin-SP-AffiniPure Donkey anti-rabbit IgG(H+L) (JIRL 711-065-152)
- Rabbit IgG (Vector Labs i-1000)
- Mouse IgG2a isotype control from murine myeloma (Sigma M5409)

Solutions

Tris-HCl 1 M(1 litre)

121,14 g Trizma

800 mL dH₂O

Ajuster le pH à l'aide de HCl concentré. Compléter à 1000mL avec dH₂O.

NaCl 1,5 M (1 litre)

87,645 g NaCl

1000 mL dH₂O

TBS pH7,5

(2 litres)

50 mM Tris-HCl pH7,5

100 mL de Tris HCl 1M

150 mM NaCl

200 mL de NaCl 1,5M

TBS pH7,5 + 0,1 M glycine (200 mL)

1,5 g glycine (PM : 75,0 g/mol)

200 mL TBS pH7,5

Démasquage d'antigènes**10mM tris pH8,0 + 1mM EDTA** (1 litre)

10 mM Tris-HCl pH8,0 10 mL de Tris-HCl 1M

1 mM EDTA 2 mL de EDTA 0,5M

10 mM Sodium Citrate Buffer:

Pour préparer 1 L, ajouter:

2.94 g sodium citrate trisodium salt dehydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)800 mL dH₂O

Ajuster le pH à 6.0

Compléter à 1000 mL avec dH₂O**Solution de blocage de peroxydase endogène** (200 mL)20 mL H₂O₂ 30%

180 mL TBS pH7,5

Solution de blocage avec sérum

79,7% TBS pH7,5

20% sérum

0,3% Triton X-100

Solution de blocage sans serum (dilution Ac)

99,7% TBS pH7,5

0,3% Triton X-100

Solution d'anticorps primaire (1:250)

1 µl d'anticorps primaire

249 µl de solution de blocage sans sérum

Solution d'anticorps secondaire (1 :500)

1 µl d'anticorps secondaire

499 µl de solution de blocage sans sérum

Solution du complexe ABC-AP et ABC-P

10 mL de TBS pH7,5

2 gouttes du réactif A du Kit ABC-AP

2 gouttes du réactif B du Kit ABC-AP

Mélanger après l'ajout de chaque réactif.

Vector-Red substrate buffer

100mM tris-HCl pH 8,2-8,5 : 1,21 g Trizma

80 mL ddH₂O

Ajuster le pH à 8,2-8,5 avec du HCl concentré.

Compléter à 100 mL.

Solution de développement Vector-Red

5 mL de *Vector-Red substrate buffer*

2 gouttes du réactif 1, puis du réactif 2, puis du réactif 3

Mélanger après l'ajout de chaque réactif.

Ajouter 5 µl de Tween-20, bien mélanger.

Ajouter 1 goutte de **levamisole**, bien mélanger. (Faire quelques up-and-down avant d'utiliser la solution)

Solution d'acétone pour le Methyl green

Mélanger ensemble

199,9 mL d'acétone

0,1 mL d'acide acétique glacial (sous la hotte)

Immunohistochimie MYOCD et α -SMA

Jour 1

1) Incubation des lames pour 60 min à 60°C.

2) Déparaffinage et réhydratation

Préparation du presto :

- Remplir le presto à la marque du minimum avec dH₂O.
- Y déposer un bac contenant 250mL de **10 mM Tris pH8 + 1 mM EDTA**.
- Mettre sur la plaque chauffante à LOW sans le couvercle.

Plonger les lames dans les bacs contenant les solutions:

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. 2X Xylène | 5 min |
| 2. Éthanol 100% | 2 min |
| 3. Éthanol 95% | 2 min |
| 4. Éthanol 80% | 2 min |
| 5. Eau (millipore) | 5 min |
| 6. TBS pH7,5 | 5 min (max : 2 heures) |

3) Perméabilisation des membranes et démasquage de l'antigène

1. Incuber dans le **TBS pH7,5 + 0,1 M glycine** pendant 10 min.
2. Déposer les lames dans le presto (chaud), fermer le couvercle.
 1. Augmenter le chauffage de la plaque jusqu'au dégagement de vapeur.
 2. Lorsque ça siffle, diminuer l'intensité de la plaque au minimum et calculer 9 min.
 3. Retirer le presto du rond chaud, attendre une forte diminution de la vapeur.
 4. Placer le presto sous un jet d'eau. (Attention qu'il n'y ait pas d'eau qui entre dans le presto par le couvercle).
 5. Ouvrir doucement le couvercle et sortir les lames.
3. Laver les lames dans le TBS pH7,5 pendant 10 min.

4) Blocage de la peroxidase endogène

1. Placer les lames dans une **solution de H₂O₂ 3%** pour 5 min.

2. Laver les lames 2X dans du TBS pour 2 min.

5) Blocage d'Avidine-Biotine

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS, tracer le contour du tissu au crayon hydrophobique et placer dans une chambre humide.
2. Appliquer la solution d'**Avidine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
3. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.
4. Appliquer la solution de **Biotine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes).
5. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.

6) Blocage des sites non spécifiques (donkey serum)

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution de **blocage**.
3. Incuber pendant 30 min à T⁰p.

7) Application de l'anticorps primaire (1:250) MYOCD

1. Une lame à la fois, aspirer la solution de blocage.
2. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps primaire** ou **isotype**.
3. Incuber à 4°C pour la nuit (O/N).

Jour 2

8) Application de l'anticorps secondaire (1:500) DAR

1. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps secondaire**.
4. Incuber 45 min à T⁰p.
5. Préparer la solution **ABC-P** (30 min avant l'application)
6. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.

9) Application des réactifs ABC-P

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution **ABC-P**.
3. Incuber 30 min à T⁰p.
4. Laver les lames 3X dans du TBS pendant 5 min.

DANS LE NOIR

10) Développement

1. Préparer la solution de **DAB** (10 min avant l'utilisation).
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de solution de **DAB**. Incuber (4 min).
4. Laver ddH₂O pendant 5 min.
5. Laver 1X TBS pour 5 min.

11) Blocage d'Avidine-Biotine

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS.
2. Appliquer la solution d'**Avidine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
3. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.
4. Appliquer la solution de **Biotine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
5. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.

12) Blocage des sites non spécifiques (goat serum)

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution de **blocage**.
3. Incuber pendant 30 min à T⁰p.

13) Application de l'anticorps primaire (1:500) α -actin

1. Une lame à la fois, aspirer la solution de blocage (sauf les contrôles négatifs).
2. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps primaire** ou **isotype**.
3. Incuber à 37°C pour 60 min.

14) Application de l'anticorps secondaire (1:500) GAM

1. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps secondaire**.
4. Incuber 60 min à T⁰p.
5. Préparer la solution **ABC-AP** (30 min avant l'application)
6. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.

15) Application des réactifs ABC-AP

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution **ABC-AP**.
3. Incuber 30 min à T⁰p.
4. Laver les lames 3X dans du TBS pendant 5 min.

DANS LE NOIR

16) Développement

1. Préparer la solution de phosphatase alcaline **Vector-Red** (utiliser dans les 15 min suivant la préparation).
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de solution de phosphatase alcaline **Vector-Red**. Incuber (8-10 min).
4. Laver 2X avec ddH₂O pendant 5 min.

17) Contre-coloration au Methyl green

Filtrer (45 min) préchauffer (30min) la solution de **Methyl green** à l'étuve à 60⁰ dans un bain avec couvercle.

1. Plonger les lames dans la solution dans l'étuve.
2. Incuber 5 min à 60⁰.
3. Rincer sous le robinet de dH₂O jusqu'à ce que l'eau soit claire.
4. Laver les lames dans dH₂O pour 1 min.

18) Montage des lames

1. Laver les lames avec la solution d'**acétone** : 10 dips
2. Déshydratation des tissus :
1X EtOH 95% 10 dips
2X EtOH 100% 10 dips
1X Xylène 30 s
3. Monter les lames avec du **Permout**.
4. Laisser à plat pour 24 heures.

Immunohistochimie pELK-1 et α -SMA

Jour 1

1) Incubation des lames pour 60 min à 60°C.

2) Déparaffinage et réhydratation

Plonger les lames dans les bacs contenant les solutions :

1. 2X Xylène (ou toluène) 5 min
2. Éthanol 100% 2 min
3. Éthanol 95% 2 min
4. Éthanol 80% 2 min
5. Eau (millipore) 5 min
6. TBS pH7,5 5 min (max : 2 heures)

3) Démasquage de l'antigène

1. Déposer les lames à T⁰p dans le **citrate buffer 10 mM pH6**.
2. Amener les lames à ébullition dans un bain-marie. 10 min à environ 95°C (plaque à 500°C pour 30 min).
3. Refroidir les lames sur la paillasse de 15 à 30 min.
4. Laver les lames 1X dans dH₂O pour 5 min.
5. Laver les lames 2X dans TBS pour 5 min.

4) Blocage de la peroxidase endogène

1. Placer les lames dans une solution de **H₂O₂ 3%** pour 5 min.
2. Laver les lames 2X dans du TBS pour 2 min.

5) Blocage d'Avidine-Biotine

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS, tracer le contour du tissu au crayon hydrophobique et placer dans une chambre humide.
2. Appliquer la solution d'**Avidine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
3. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.
4. Appliquer la solution de **Biotine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
5. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.

6) Blocage des sites non spécifiques (donkey serum)

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution de **blocage**.
3. Incuber pendant 30 min à T⁰p.

7) Application de l'anticorps primaire (1:250) pELK-1

1. Une lame à la fois, aspirer la solution de blocage.
2. Couvrir les tissus de la solution **d'anticorps primaire** ou **isotype**.
3. Incuber à 4°C pour la nuit (O/N).

Jour 2

8) Application de l'anticorps secondaire (1:500) DAR

1. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de la solution **d'anticorps secondaire**.
4. Incuber 45 min à T⁰p.
5. Préparer la solution **ABC-P** (30 min avant l'application).
6. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.

9) Application des réactifs ABC-P

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution **ABC-P**.
3. Incuber 30 min à T⁰p.
4. Laver les lames 3X dans du TBS pendant 5 min.

DANS LE NOIR

10) Développement

1. Préparer la solution de **DAB** (10 min avant l'utilisation).
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de solution de **DAB**. Incuber (4 min).
4. Laver ddH₂O pendant 5 min.

11) Blocage d'Avidine-Biotine

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS.
2. Appliquer la solution d'**Avidine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)
3. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.
4. Appliquer la solution de **Biotine** sur les tissus, incuber 10 min. (2-3 gouttes)

5. Laver les lames 2X dans du TBS pour 5 min.

12) Blocage des sites non spécifiques (goat serum)

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution de **blocage**.
3. Incuber pendant 30 min à T⁰p.

13) Application de l'anticorps primaire (1:500) α -actin

1. Une lame à la fois, aspirer la solution de blocage.
2. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps primaire** ou **isotype**.
3. Incuber à 37°C pour 60 min.

14) Application de l'anticorps secondaire (1:500)

1. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de la solution d'**anticorps secondaire**.
4. Incuber 60min à T⁰p.
5. Préparer la solution **ABC-AP** (30 min avant l'application).
6. Laver les lames 3X dans du TBS pH7,5 pendant 5 min.

15) Application des réactifs ABC-AP

1. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
2. Couvrir les tissus avec la solution **ABC-AP**.
3. Incuber 30 min à T⁰p.
4. Laver les lames 3X dans du TBS pendant 5 min.

DANS LE NOIR

16) Développement

1. Préparer la solution de phosphatase alcaline **Vector-Red**. Utiliser dans les 15 min suivant la préparation.
2. Une lame à la fois, retirer l'excès de TBS et placer dans une chambre humide.
3. Couvrir les tissus de solution de phosphatase alcaline **Vector-Red**. Incuber (8-10 min).
4. Laver 2X avec ddH₂O pendant 5 min.

17) Contre-coloration au Methyl green

Filtrer (45 min) et préchauffer (30 min) la solution de **Methyl green** à l'étuve à 60⁰ dans un bain avec couvercle.

1. Plonger les lames dans la solution dans l'étuve.
2. Incuber 5 min à 60⁰.
3. Rincer sous le robinet de dH₂O jusqu'à ce que l'eau soit claire.
4. Laver les lames dans dH₂O pour 1 min.

18) Montage des lames

1. Laver les lames avec la solution d'**acétone** : 10 dips
2. Déshydratation des tissus : 1X EtOH 95% 10 dips
2X EtOH 100% 10 dips
1X Xylène 30 s
3. Monter les lames avec du **Permout**.
4. Laisser à plat pour 24 heures.