

Université de Montréal

Évaluation quantitative de l'oxyde nitrique produit par les neutrophiles sanguins de  
chevaux sains

par

Capucine Lapointe Corriveau

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Décembre 2004

© Capucine Lapointe Corriveau, 2004



SF  
607  
U54  
2005  
v.021

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation quantitative de l'oxyde nitrique produit par les neutrophiles sanguins de  
chevaux sains

Présenté par :  
Capucine Lapointe Corriveau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

André Bisailon : président-rapporteur  
Daniel Jean : directeur de recherche  
Jean-Pierre Lavoie : codirecteur de recherche  
Sheila Laverty : membre du jury

## RÉSUMÉ

L'oxyde nitrique (NO) est un gazotransmetteur jouant un rôle majeur dans le signalement cellulaire et est impliqué dans plusieurs processus pathologiques. Plusieurs types de cellules dont les leucocytes peuvent produire du NO. Chez d'autres espèces, il a été démontré que les neutrophiles pouvaient sécréter du NO. Cependant, le rôle biologique de cette production reste indéterminé. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer si le neutrophile sanguin pouvait produire du NO *ex-vivo*, d'en évaluer la cinétique de sécrétion et de mesurer l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Quatre chevaux normaux furent étudiés dans ce projet. Les neutrophiles sanguins ont été isolés par une technique de gradient de densité et ont été stimulés avec des lipopolysaccharides (LPS) et de l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ). La production de NO fut déterminée à 6 et 12 h de façon indirecte par la mesure de nitrites (NO<sub>2</sub>) et de nitrates (NO<sub>3</sub>) (NO<sub>x</sub>) avec la technique de Griess. L'ARNm de la iNOS a été recherché à partir d'une technique de RT-PCR en temps réel. Les résultats montrent une sécrétion basale de NO et une augmentation significative de la production de NO aux temps d'incubation 6 et 12 h. Malgré l'utilisation de plusieurs amorces, les mesures de l'ARNm de la iNOS n'ont pas été concluantes. Cette étude a permis de mettre en évidence le NO produit par les neutrophiles sanguins de chevaux sains et pourrait servir de base à l'étude du rôle du NO sécrété par les neutrophiles sanguins équins dans un modèle d'inflammation pulmonaire comme le souffle.

Mots clés : neutrophiles sanguins; iNOS; inflammation; nitrate; nitrite; PCR; ARNm; LPS; IFN- $\gamma$

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO) plays an important role in cell signaling and is involved in many pathological processes. Many kinds of cells, like leucocytes can produce NO. In some species, it was found that neutrophils can produce NO. However, the biological role of this production is unknown. The objectives of our study was to determine if blood neutrophils have the capacity to produce NO *ex vivo*, to evaluate the kinetic of this secretion and to quantify the inducible nitric oxide synthase (iNOS). Four healthy horses were used for this project. Blood neutrophils were isolated by a density gradient technique and stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). NO production was determined at 6 and 12 h quantifying indirectly nitrite (NO<sub>2</sub>) and nitrate (NO<sub>3</sub>) (NO<sub>x</sub>) with the Griess technique. We studied the expression of iNOS gene by a (RT-PCR) technique. The results showed a basal secretion of NO and a significant augmentation after 6 and 12 h of incubation. Unfortunately, even with the use of many different sets of primers, the iNOS mRNA quantification was not conclusive. This study showed that blood neutrophils provided by healthy horses can produce NO. Those results should be used as a base for a study of the function of NO produced by horse's blood neutrophils in an inflammatory model as horses.

Keywords : blood neutrophils; iNOS; inflammation; nitrate; nitrite; PCR; mRNA; LPS; IFN- $\gamma$

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	xii
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS.....	xvi
INTRODUCTION.....	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	4
1. L' OXYDE NITRIQUE.....	5
1.1 GÉNÉRALITÉS.....	5
1.2 SYNTHÈSE DU NO.....	6
1.3 OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS).....	7
1.3.1 GÉNÉRALITÉS.....	7
1.3.1 A) DIFFÉRENTS TYPES DE NOS.....	10
1.3.1 AD) nNOS.....	10
1.3.1 AII) eNOS.....	10
1.3.1 AIII) iNOS.....	11
1.3.2 ESPÈCE ÉQUINE.....	12
1.4 RÔLES PHYSIOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES.....	13
1.4.1 ENDOTHÉLIUM VASCULAIRE.....	13
1.4.2 CELLULES IMMUNITAIRES.....	14
1.4.2 A) NEUTROPHILES.....	14
1.4.2 B) MACROPHAGES.....	15
1.4.2 C) LYMPHOCYTES.....	16
1.4.3 PLAQUETTES.....	16
1.4.4 SYSTÈME NERVEUX.....	17

1.5	RÔLES DANS LES PROCESSUS IMMUNITAIRES.....	18
1.5.1	NON-SPÉCIFIQUES.....	18
1.5.1 A)	INFECTIONS .....	19
1.5.2	L'ASTHME HUMAIN.....	20
1.6	MÉTABOLISME DE L'OXYDE NITRIQUE.....	20
2.	LES NEUTROPHILES.....	22
2.1	GÉNÉRALITÉS.....	22
2.2	RÔLE DANS LA RÉACTION IMMUNITAIRE.....	24
2.2.1	ADHÉSION LEUCOCYTAIRE.....	25
2.2.1 A)	MOLÉCULES D'ADHÉSION.....	25
2.2.1 A I)	INTÉGRINES.....	26
2.2.1 A II)	SÉLECTINES.....	26
2.2.1 A III)	MEMBRES DE LA FAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES (IG).....	27
2.2.1 B)	MODÈLE DE MIGRATION TRANS-ENDOTHÉLIALE.....	28
2.2.1 B I)	MARGINALISATION.....	29
2.2.1 B II)	ROULEMENT.....	31
2.2.1 B III)	ADHÉSION.....	31
2.2.1 B IV)	DIAPÉDÈSE.....	32
2.2.1 B V)	MIGRATION.....	33
2.2.2	ACTIVATION LEUCOCYTAIRE AU SITE D'INFLAMMATION.....	34
2.2.3	ACTIVITÉ ANTI-MICROBIENNE.....	35
2.2.4	RÔLE DU NEUTROPHILE DANS LE SOUFFLE.....	36
2.2.5	NO ET RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE.....	37
2.2.5 A)	NO PRODUIT CONSTITUTIVEMENT ET RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE...37	
2.2.5 B)	EFFET DU NO SUR L'ADHÉSION LEUCOCYTAIRE.....	37
2.2.5 B I)	MODULATION DE L'EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION.....	38
2.2.6	CYTOKINES.....	39
2.3	NEUTROPHILES PULMONAIRES.....	40
3.	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	41
3.1	HYPOTHÈSES.....	41



3.2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	41
	MÉTHODOLOGIE.....	42
4.	ANIMAUX.....	43
5.	PROTOCOLES.....	43
5.1	ISOLEMENT DES NEUTROPHILES.....	43
5.1.1	TYPE DE GRADIENT DE DENSITÉ UTILISÉ .....	43
5.1.2	PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS SANGUINS.....	44
5.1.3	ISOLEMENT DES NEUTROPHILES .....	44
5.1.4	ISOLEMENT DES LEUCOCYTES.....	46
5.1.5	COMPTAGE CELLULAIRE.....	46
5.1.6	PURETÉ CELLULAIRE.....	47
5.2	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	47
5.2.1	STIMULATION ET INCUBATION DES NEUTROPHILES ET DES LEUCOCYTES SANGUINS TOTAUX.....	47
5.2.2	CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS.....	47
5.3	QUANTIFICATION DES NITRITE ET NITRATE PAR LE NITRATE/NITRITE COLORIMETRIC ASSAY KIT (LDH METHOD).....	48
5.4	QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA iNOS ÉQUINE PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL (LIGHT CYCLER).....	51
5.4.1	RÉACTIFS.....	52
5.4.2	PCR EN TEMPS RÉEL.....	53
5.4.2 A)	LIGHT CYCLER.....	53
5.4.3	EXTRACTION DE L'ARNm.....	57
5.4.4	FORMATION D'ADNc (RT).....	58
5.4.5	QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE (PCR).....	59
5.4.5 A)	AMORCES UTILISÉES POUR LA MÉTHODE DE PCR DE LA iNOS ÉQUINE.....	59
5.4.5 B)	PRÉPARATION DU MÉLANGE POUR LA RÉACTION DE PCR.....	59
5.4.5 C)	CONDITIONS D'AMPLIFICATION.....	60
5.4.5 D)	OBSERVATION DES RÉSULTATS DE PCR PAR ÉLECTROPHORÈSE.....	60
5.5	DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'ADN AMPLIFIÉE PAR PCR.....	61

5.5.1	EXTRACTION DE L'ADN DU GEL D'ÉLECTROPHORÈSE.....	61
5.5.2	CLONAGE DE LA SÉQUENCE D'ADN EXTRAITE DANS UN VECTEUR PLASMIDIEN.....	62
5.5.2 A)	LIGATION DES PRODUITS DE PCR AVEC LE VECTEUR PGEM®-T.....	62
5.5.2 B)	TRANSFORMATION DES BACTÉRIES DH5 $\alpha$ .....	62
5.5.2 C)	MISE EN CULTURE EN MILIEU LIQUIDE DES BACTÉRIES TRANSFORMÉES.....	63
5.5.2 D)	MINIPREP DES PLASMIDES PGEM®-T EASY + INSERT.....	63
	PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS.....	65
6.	ISOLEMENT CELLULAIRE.....	66
6.1	VIABILITÉ CELLULAIRE.....	66
6.2	PURETÉ CELLULAIRE.....	67
7.	DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE NITRITE ET NITRATE.....	68
8.	QUANTIFICATION DE L'ARNM DE LA INOS ÉQUINE.....	71
	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	74
	CONCLUSION.....	80
	SOURCES DOCUMENTAIRES.....	82
	ANNEXE.....	xvii
	ADRESSES DES FABRICANTS.....	xviii

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Cellules et tissus produisant du NO.....	6
Tableau II :	Principaux constituants des granules des neutrophiles.....	24
Tableau III :	Molécules d'adhésion dans le processus de migration trans- endothéliale.....	30
Tableau IV :	Pourcentage (%) de viabilité des neutrophiles ou des leucocytes totaux avant incubation ( $T_0$ ) et après 12 h d'incubation ( $T_{12}$ ) chez les différents chevaux.....	66
Tableau V :	Pourcentage (%) de pureté des neutrophiles dans le milieu de culture pour les différents chevaux.....	67
Tableau VI :	Détermination de la concentration en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) de nitrite et nitrate produits par les neutrophiles et les leucocytes totaux en triplicatas en fonction du temps ( $T_0$ , $T_6$ , $T_{12}$ ) en heure (h).....	68

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Représentation de la synthèse du NO par la NOS.....	8
Figure 2 :	Représentation des gènes des 3 différents types de NOS.....	9
Figure 3 :	Représentation de la migration trans-endothéliale des neutrophiles...	29
Figure 4 :	Mode d'action des réactifs <i>Griess Reagent 1 et 2</i> .....	49
Figure 5 :	Représentation de la fluorescence émise par le SYBR Green I avant le début de la réaction (A) et lors de l'hybridation entre les amorces et les brins d'ADN (B).....	54
Figure 6 :	Représentation de la fluorescence émise par le SYBR Green I lors de l'élongation.....	55
Figure 7 :	Représentation d'un graphique de fluorescence en fonction du nombre de cycle (A) et d'un graphique d'une courbe de fusion (B).....	55
Figure 8 :	Représentation d'une courbe de la dérivée négative en fonction de la température.....	56
Figure 9 :	Graphique démontrant la quantité de nitrite et nitrate en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) produits par les neutrophiles sanguins isolés et stimulés en fonction de leur temps d'incubation (0 h, 6 h et 12 h) * significativement différents à un $p < 0,05$ .....	69

- Figure 10 : Graphique démontrant la quantité de nitrite et nitrate en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) produits par les leucocytes sanguins totaux isolés et stimulés en fonction de leur temps d'incubation (0 h, 6 h et 12 h) \* significativement différent à un  $p < 0,05$  .....70
- Figure 11 : Fragment d'ADN de iNOS équine démontré par électrophorèse.....71
- Figure 12 : Représentation de la courbe de fusion (A) et de la courbe de la dérivé négative en fonction de la température (B) de la iNOS par RT-PCR en temps réel.....72
- Figure 13 : Représentation de sections de la séquence d'ADN provenant du fragment cloné (b) accolée à la portion de séquence de la iNOS équine (a) provenant de la séquence de la iNOS équine caractérisée par Hammond (AY027883) et publiée sur Pubmed.....73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire à l'ARN
AMV-RT :	Avian myeloblastose virus reverse transcriptase / enzyme de transcription inversée du virus de la myéloblastose aviaire
ADP :	Adénosine diphosphate
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
BH <sub>4</sub> :	Tétrahydrobioptérine
C5a :	Composé 5a du complément
Ca <sub>2</sub> <sup>+</sup> :	Ion calcium
CD :	Cluster of differentiation / Clé de différenciation
DNTP :	Désoxynucléotides triphosphates
EDRF :	Endothelium derived relaxing factor / facteur relaxant dérivé de l'endothélium
eNOS :	Endothelial nitric oxide synthase / oxyde nitrique synthase endothéliale
FAD :	Flavine-adénine dinucléotide
fMLP :	N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
FMN :	Flavine mononucléotide
FcγRII :	Récepteur Fc 2 des immunoglobulines de type G
G-CSF :	Granulocytes colony-stimulating factor / Facteur stimulant des granulocytes
GM-CSF :	Granulocytes/macrophages colony-stimulating factor / Facteur stimulant des granulocytes et des macrophages
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GRO-α/β :	Growth-related gene product / Facteur oncogène relié à la croissance
GTP :	Guanosine triphosphate

H :	Hydrogène
Hb :	Hémoglobine
IAP :	Integrin-associated protein / protéine associée aux intégrines
ICAM :	Intercellular adhesion molecules / molécules d'adhésion intercellulaire
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IL :	Interleukine
iNOS :	Inducible nitric oxide synthase / oxyde nitrique synthase inductible
LAD :	Leukocyte adhesion deficiency / déficience d'adhésion leucocytaire
LFA-1 :	Leukocyte functional antigen
L-NAME :	N <sup>W</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
L-NMMA :	N <sup>W</sup> -monomethyl-L-arginine
LPS :	Lipopolysaccharide
LT :	Leucotriène
MgCl <sub>2</sub> :	Chlorure de magnésium
MMLV-RT :	virus Moloney de la leucémie murine
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK :	Natural killer cell / cellule tueuse naturelle
nNOS :	Neuronal nitric oxide synthase / oxyde nitrique synthase neuronale
NO :	Oxyde nitrique (monoxyde d'azote)
NO <sub>2</sub> :	Nitrite
NO <sub>3</sub> :	Nitrate
O <sub>2</sub> :	Dioxygène
Oligo(dT) :	Résidus désoxythymidine
PAF :	Platelet activating factor / facteur activateur des plaquettes
PCR :	Polymerase chain reaction / réaction en chaîne par la polymérase
PDGF :	Platelet derived growth factor / facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM :	Platelet-endothelial cell adhesion molecule / molécule d'adhésion entre les plaquettes et l'endothélium

PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PMN :	Polymorphonucléaire
PSGL-1 :	P-sélectine glycoprotéine ligand-1
RPM :	Rotation par minute
RT :	Reverse transcription / transcription inversée
s-Le <sup>x</sup> :	Sulfate-sialyl-Lewis <sup>x</sup>
TGF :	Transforming growth factor / facteur transformant de croissance
Th :	Lymphocyte T helper CD4+ / lymphocyte T accessoire
TNF :	Tumor necrosis factor / facteur nécrosant des tumeurs
VCAM :	Vascular cell adhesion molecule / molécule d'adhésion des cellules vasculaires
XO :	Xanthine oxydase



## DÉDICACE

*à Eric, sans qui toute cette  
aventure n'aurait été possible*

*Merci beaucoup! 🌸*

## REMERCIEMENTS

Je désire en premier lieu remercier les Dr. Daniel Jean et Jean-Pierre Lavoie qui m'ont permis d'accomplir ma maîtrise dans leur laboratoire. Ensuite, je dois remercier chaleureusement Emma Hamilton, l'agente de recherche du Dr. Lavoie, sans qui, la grande majorité de mon travail n'aurait pu être possible. Elle m'a inculqué le désir de chercher toujours d'avantage une meilleure solution aux divers problèmes rencontrés. Elle a de plus pris le temps de m'enseigner plusieurs des techniques de laboratoire que j'ai utilisées lors de mes études. Finalement, elle a su m'apprendre beaucoup de choses sur les chevaux, tant sur leur santé que comme entraîneuse et pour tout cela, je ne la remercierai jamais assez.

La maîtrise est un travail de tout instant qui requiert beaucoup de patience, de temps et d'énergie. Pour toute la compréhension qu'il a su me témoigner, je remercie du fond du cœur, mon amoureux, Eric, qui m'a épaulée durant ces deux dernières années. Je me dois également de remercier mes amis du département de Sciences Biologiques de l'Université de Montréal, Alexandre Poulain, Fabian Soza, Sandrine Joly, Stéphanie Lamoureux, Rachel Massicotte et Abdellatif Nemri pour leur soutien moral, et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, ainsi qu'Hakima Moukhles, professeur du département pour son support technique.

Finalement, je souhaite remercier mes parents pour m'avoir inculqué la persévérance, la rigueur dans mon travail et le dépassement de soi-même. Ils ont su me motiver à aller plus loin, à repousser la limite de mes connaissances, ce qui a créé en moi une passion pour les sciences.

# ***INTRODUCTION***

L'oxyde nitrique (NO) est une molécule qui se présente sous forme gazeuse et qui est capable de diffuser facilement à travers les membranes biologiques. Chez les mammifères, le NO a été mis en évidence dans plusieurs cellules et semble impliqué dans plusieurs fonctions biologiques, dans des domaines aussi variés que les systèmes immunitaire, nerveux et cardiovasculaire (Moncada and Higgs 1995). Le NO joue un rôle critique dans le signalement cellulaire et a été incriminé dans la physiopathologie de plusieurs maladies (Nathan 1992; Moncada and Higgs 1993). Le NO est produit par différents types de NO synthases (NOS) (Moncada 1992). Les NOS neuronale et endothéliale sont exprimées de façon constitutive. Toutefois, les NOS inductibles, retrouvées dans les cellules du système immunitaire, produisent une grande quantité de NO pendant de longue durée et ont une activité cytotoxique et antiproliférative (Vodovotz, Kwon et al. 1994). La NOS inductible pourrait jouer un rôle majeur dans plusieurs types de processus inflammatoires et immunitaires (Heiss, Lancaster et al. 1994). De plus, chez quelques espèces, il a été montré que le NO avait un effet cytotoxique contre plusieurs pathogènes incluant les fungi, les parasites, les bactéries et les protozoaires (Liew and Cox 1991). Chez le cheval, il a été entre autre démontré que le NO jouait un rôle dans la pathogenèse de ostéoarthrite (Tung, Venta et al. 2002).

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) constituent la première ligne de défense du système immunitaire lors de la réponse inflammatoire. Dans le passé, les neutrophiles ont été considérés comme des cellules différenciées terminales et on a longtemps cru que leurs fonctions étaient réduites à un rôle effecteur primaire de phagocytose et de production de formes réactives de l'oxygène et d'enzymes protéolytiques. Plusieurs études récentes montrent que les neutrophiles sanguins de plusieurs espèces, dont le cheval, sont capables de synthétiser des médiateurs inflammatoires et d'exprimer des récepteurs qui sont impliqués dans plusieurs types de processus inflammatoires et pouvant jouer un rôle plus actif dans la réponse immunitaire (Joubert, Silversides et al. 2001). Certains de ces médiateurs inflammatoires sont impliqués dans l'immunomodulation de la réponse aiguë

(Cassatella 1999) et jouent un rôle actif dans la physiopathologie des maladies neutrophiliques équine.

Plusieurs tissus peuvent générer du NO dans des situations pathologiques et les leucocytes pourraient sécréter ce médiateur de façon significative. Des études précédentes ont montré que les neutrophiles sanguins humains et de rat ont la capacité de produire du NO à l'état basal ainsi que suite à des stimulations (Wright, Mülsch et al. 1989; Fierro, Nascimento-DaSilva et al. 1999). L'incubation des neutrophiles sanguins de rats normaux *in vitro* avec des activateurs de neutrophiles (PAF, leucotriènes B4 et l'interleukine-8), différentes cytokines (Interleukine-1, TNF-alpha et l'INF-gamma) montraient que seul l'INF-gamma était capable de stimuler une production importante de NO.

Chez le cheval, le rôle du NO généré par les neutrophiles sanguins en présence d'une réaction inflammatoire systémique ou localisée est inconnu. Il est toutefois possible qu'il puisse jouer un rôle dans la physiopathologie de maladies neutrophiliques équine telles que le souffle. Ce projet tente donc de mettre en évidence le NO et l'iNOS produits et sécrétés par les neutrophiles sanguins chez le cheval sain et d'en déterminer la cinétique de sécrétion *ex vivo*.

# ***RECENSION DE LA LITTÉRATURE***

# ***1. L'OXYDE NITRIQUE***

## **1.1 GÉNÉRALITÉS**

Furchgott et Zawadzki ont démontré, en 1980 que la vasodilatation induite par l'acétylcholine était médiée par un facteur humoral labile libéré par l'endothélium vasculaire. Cette molécule fut nommée facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) (Furchgott and Zawadzki 1980). Les propriétés chimiques de ce facteur ont permis de l'identifier comme étant de l'oxyde nitrique (NO).

Le NO est une petite molécule inorganique de 30 daltons (Da) produit par un grand nombre de cellules et tissus (voir tableau I page 6), qui se présente sous forme gazeuse, qui possède une brève demi-vie et capable de diffuser facilement à travers les membranes biologiques, en raison de son caractère lipophile.

Les rôles du NO sont maintenant bien établis. Il agit dans la transduction de signaux, servant de messenger entre les cellules, permettant ainsi la stimulation de la synthèse du second messenger guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPc) dans la cellule cible (Moncada, Palmer et al. 1991; Nathan 1992). Sa synthèse, par l'endothélium vasculaire, est responsable de la vasodilatation qui est essentiel pour la régulation de la pression sanguine. De plus, il joue un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central, lui permettant d'accomplir diverses fonctions telles que dans le processus de mémorisation. Dans le système nerveux périphérique, il agit via un réseau de nerfs nonadrenergiques et noncholinergiques afin de moduler certaines formes de vasodilatations neurogéniques et réguler diverses fonctions gastro-intestinales, respiratoires et uro-génitales (Moncada, Palmer et al. 1991). Le NO est de plus impliqué dans le système immunitaire, grâce à ces propriétés cytotoxiques, bactéricides et cytostatiques, afin de tuer ou d'inhiber la croissance d'organismes

étrangers, ainsi que dans la modulation de la migration des leucocytes, dont les neutrophiles (Moncada and Higgs 1993).

**Tableau I : Cellules et tissus produisant du NO**

Neutrophile	Hépatocyte	Muscle lisse vasculaire
Macrophage	Neurone	Muscle lisse de l'utérus + oviducte
Chondrocyte	Astrocyte	Myocyte cardiaque
Ostéoclaste	Cellule mésangiale	Endothélium
Fibroblaste	Mégacaryocyte	Cellule des îlots pancréatiques
Kératinocyte	Cellule tumorale	Épithélium respiratoire
Cellule de Kupffer		Épithélium rénal tubulaire

## 1.2 SYNTHÈSE DU NO

En 1988, des études ont démontré que l'acide aminée L-arginine était le précurseur de la synthèse de NO produit par les cellules de l'endothélium vasculaire (voir figure 1 page 8). En effet, des cellules endothéliales mises en culture en absence de L-arginine pendant 24 heures, démontrent une diminution dans la sécrétion de EDRF induite par la bradykinine (Palmer, Ashton et al. 1988 a). Ce phénomène peut être inhibé par l'ajout de L-arginine et non de D-arginine (Palmer, Ashton et al. 1988 a). D'autres expériences utilisant la spectrométrie de masse et le  $[^{15}\text{N}]$ L-arginine ont démontré la formation de  $^{15}\text{NO}$  à partir du nitrogène guanidine terminal de la L-arginine lorsque les cellules étaient stimulées avec de la bradykinine (Palmer, Ashton et al. 1988 a). La conversion de la L-arginine en NO est spécifique, car des substances analogues à celle-ci, tel que son énantiomère la D-arginine, ne peuvent pas être utilisées comme substrats (Palmer, Ashton et al. 1988 a; Palmer, Rees et al. 1988 b). De plus, des substances pharmacologiques comme la  $\text{N}^{\text{W}}$ -



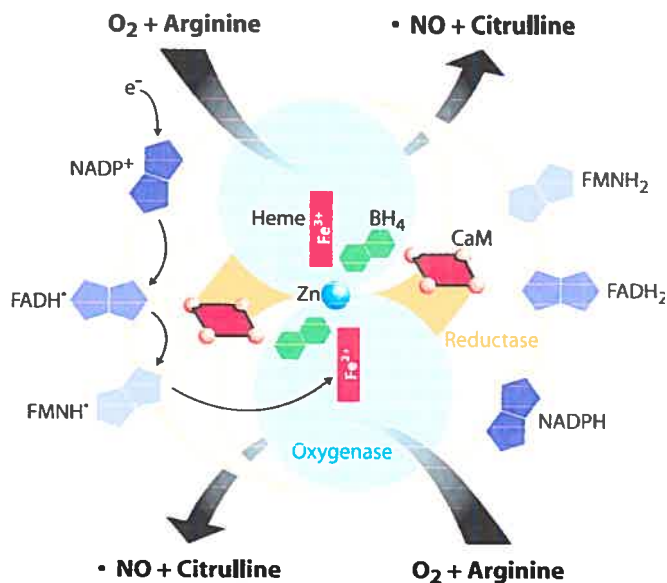
monométhyl-L-arginine (L-NMMA) peuvent inhiber la sécrétion de NO de façon énantiomère spécifique (Palmer, Rees et al. 1988 b).

Il a été démontré que la réaction enzymatique engendrant la production de NO impliquait également la production de citrulline. En effet, les cellules endothéliales peuvent former de la citrulline à partir de la L-arginine par un mécanisme dépendant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et qui peut être inhibé par le L-NMMA (Palmer and Moncada 1989).

### **1.3 OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS)**

#### *1.3.1 Généralités*

Chez les mammifères, l'enzyme responsable de la synthèse du NO, à partir de la L-arginine, est appelée oxyde nitrique synthase ou NO-synthase (NOS) (Moncada, Palmer et al. 1991). Elle est un homodimère (~300 kDa) dont les monomères sont deux enzymes fusionnées. La première, un cytochrome réductase et la seconde, un cytochrome qui requiert trois co-substrats (L-arginine, NADPH et O<sub>2</sub>) ainsi que cinq co-facteurs (la flavine-adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), la calmoduline, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et la protoporphyrine IX (hème)) (Nathan and Xie 1994 b). Les sous-unités ont respectivement un poids moléculaire entre 130 et 160 kDa pour la NOS neuronale (nNOS) et entre 130 et 135 kDa pour la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS) (Park, Krishna et al. 2000). Les NO-synthases possèdent des sites de reconnaissance pour le NADPH ainsi que pour la FAD et la FMN, un groupe prosthétique hème, ainsi que des sites de phosphorylations. La présence du co-facteur BH<sub>4</sub> est essentielle pour l'activité des NO-synthases (voir figure 2 page 9) (Moncada and Higgs 1993).

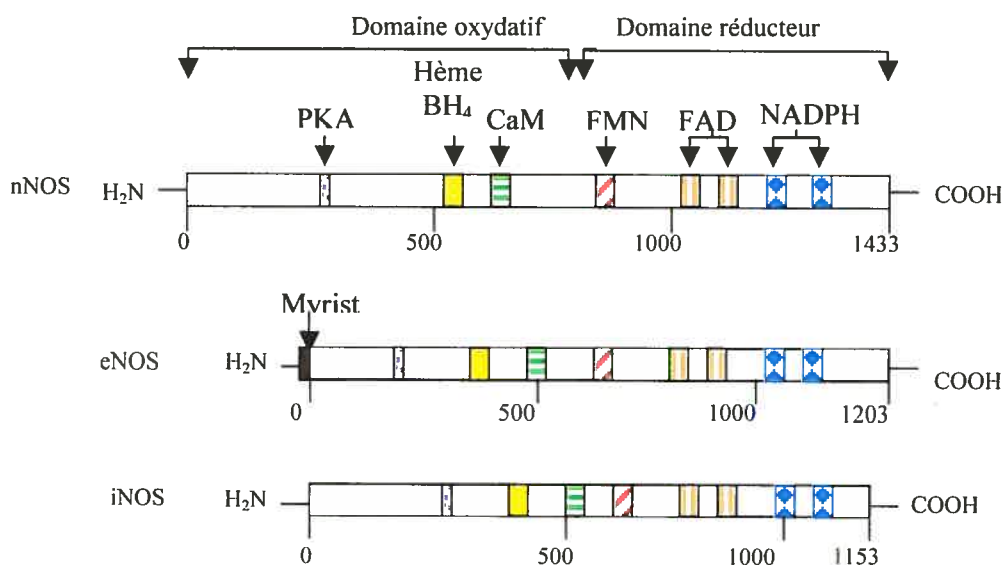


**Figure 1 : Représentation de la synthèse du NO par la NOS (tirée du protocole de Cayman chemical du produit *Nitrate/nitrite Colorimetric Assay kit (LDH Method) (760871)*)**

La réaction catalytique se déroulerait en deux étapes. Tout d'abord, la L-arginine est hydroxylée par l'oxygène et le NADPH afin de permettre la formation d'un intermédiaire, le N- $\omega$ -hydroxy-L-arginine. Ensuite, ce N- $\omega$ -hydroxy-L-arginine est oxydé et conduit à la production de la L-citrulline, d'hydrogène (H), de NADP d'H<sub>2</sub>O et du NO.

La classification des différents types de NO-synthases a été effectuée selon la découverte mentionnant que les enzymes du cerveau et de l'endothélium vasculaire sont généralement constitutives et sont dépendantes de la présence de calcium et de calmoduline (d'où provient la lettre c) alors que celle présente dans les macrophages est généralement inducible, calcium indépendante (d'où provient la lettre i) et fortement liée à la calmoduline (Cho, Xie et al. 1992). Toutefois, il a été démontré que la NO-synthase calcium-dépendante pouvait être induite dans les intestins de rat traités avec des endotoxines (Salter, Knowles et al. 1991).

Il existe trois isoformes de NO-synthases : NO-synthase neuronale (type I), la NO-synthase endothéliale (type III) et la NO-synthase inductible (type II). Les NOS de type constitutif (type I et III) sécrètent du NO pendant quelques minutes, lorsque la quantité de calcium intracellulaire est assez grande pour permettre une liaison avec la calmoduline, cette production est de l'ordre du picomole (Malinski and Taha 1992). Le NO sécrété par ces enzymes en réponse à des stimulants sert de mécanisme de transduction dans différents types de réponses physiologiques. Cependant, la iNOS est exprimée par des macrophages, des cellules endothéliales et d'autres types cellulaires activés, suite à une stimulation avec un agent pathogène ou avec un stimulus inflammatoire (Nathan 1992). Elle génère alors de grandes quantités de NO pendant des périodes allant jusqu'à 5 jours, cette fois, la production est de l'ordre du nanomole (Vodovotz, Kwon et al. 1994). Le NO ainsi produit possède une activité cytotoxique agissant contre les agents infectieux et les cellules tumorales. Toutefois, sa production a d'autres conséquences biologiques incluant une vasodilatation et des dommages tissulaires chez l'hôte (Heiss, Lancaster et al. 1994). L'induction de la iNOS peut être inhibée par des glucocorticoïdes (Moncada, Palmer et al. 1991).



**Figure 2 : Représentation des gènes des 3 différents types de NOS**

### **1.3.1 a) Différents types de NOS**

#### **1.3.1 aI) nNOS**

Le gène codant pour la nNOS est situé sur le long bras du chromosome 12 et l'ARNm qui en est synthétisé a une taille de ~12 (kb) (Xu, Gorman et al. 1993). La synthèse du NO par cette isoenzyme cytosolique dépend, tel que mentionné auparavant, de la présence de  $Ca^{2+}$ , de la présence de calmoduline et possède des sites de liaisons pour FAD, FMN, NADPH, calmoduline, ainsi que pour les protéines kinases A et C (PKA, PKC) (Knowles and Moncada 1994). La nNOS a été démontrée dans plusieurs tissus tels que les nerfs périphériques, la moelle épinière et les muscles squelettiques humains (Krukoff 1998).

#### **1.3.1 aII) eNOS**

Le gène codant pour la eNOS est situé dans la région péricentrique du chromosome 7 et l'ARNm correspondant à une taille de ~4.2 à 4.4 kb (Park, Krishna et al. 2000). La eNOS a une fonction similaire à la nNOS, partageant des sites de liaisons pour la FMN, la FAD, la PKA et calmoduline, mais possède une particularité; la présence d'un site de myristoylation à la partie N-terminale qui est responsable de l'association membranaire de l'enzyme (Sessa, Barber et al. 1993). Par conséquent, la eNOS peut être présente sous forme cytosolique et particulaire (Knowles and Moncada 1994). La eNOS a été démontrée dans les cellules endothéliales des artères (Lamas, Marsden et al. 1992) et des veines (Janssens, Shimouchi et al. 1992). Le NO ainsi produit joue un rôle important dans la régulation de la microcirculation et dans le contrôle du tonus des cellules du muscle lisse vasculaire (Thomas, Liu et al. 2001). Puisque l'activité catalytique de la eNOS est strictement dépendante de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ , plusieurs agonistes affectant le calcium peuvent interférer avec la synthèse de NO. Ainsi, la production

basale *in vivo* et *in vitro* de NO par les cellules endothéliales peut être augmentée par des stimuli tel que la bradykinine, l'acétylcholine, l'ATP, l'ADP, la substance P, la sérotonine, la noradrénaline, le facteur activateur de plaquette (PAF) (Lirk, Hoffmann et al. 2002).

### 1.3.1 aIII) *iNOS*

Le gène de la *iNOS* est situé sur le chromosome 17 (Xu, Charles et al. 1994). Contrairement aux isoformes constitutifs, la *iNOS* fonctionne indépendamment du  $Ca^{2+}$ . Toutefois, la calmoduline est liée par un lien non-covalent à la *iNOS* et constitue ainsi une sous-unité essentielle de cette isoforme (Cho, Xie et al. 1992). L'activité de la *iNOS* a été démontrée dans plusieurs types de cellules et tissus, généralement en présence d'endotoxines (LPS) ou de médiateurs pro-inflammatoires endogènes (INF- $\gamma$ ): macrophages, chondrocytes, cellules de Kupffer, hépatocytes, neutrophiles, épithélium pulmonaire et vasculaire. De récentes études suggèrent que la *iNOS* pourrait agir de façon constitutive dans l'épithélium pulmonaire ainsi que dans l'intestin grêle (Kobzik, Bredt et al. 1993).

La *iNOS* est hautement régulée par les cytokines. L'INF- $\gamma$ , l'IL-1b, l'IL-6 et le TNF induisent l'enzyme seule ou combinée dans différents systèmes. En effet, ces stimuli engendrent l'activation de la tyrosine kinase qui à son tour entraîne l'activation du facteur de transcription nucléaire NF $\kappa$ B via la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur (I) $\kappa$ B. Le facteur NF $\kappa$ B sera transloqué dans le noyau engendrant la transcription de l'ARNm codant pour le gène de la *iNOS* suivi de sa traduction (Ricciardolo, Sterk et al. 2004). D'autres cytokines telles que l'IL-4, l'IL-8, l'IL-10, le facteur transformant de croissance  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) sont des inhibiteurs de l'induction (Liew, Li et al. 1991; McCall, Palmer et al. 1992). Dans la majorité des études *in vitro*, seulement la combinaison

de plusieurs cytokines a démontré avoir la capacité de produire une grande expression du gène de la iNOS, alors qu'un seul de ces stimuli démontrait un effet modéré (Geller, de Vera et al. 1995). Ceci suggère qu'au moins deux types de voie signalitique transductionnelle seraient nécessaires pour sur-réguler de façon optimale l'expression de la iNOS. L'IL-4 et l'IL-10 générées par les lymphocytes de type Th2, qui sont des inhibiteurs de la défense de l'hôte, inhibent la production de NO par les macrophages alors que l'INF- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  produits par les lymphocytes de type Th1, qui sont des promoteurs de la défense, induisent la synthèse de NO par les macrophages (Liew, Li et al. 1991).

### 1.3.2 Espèce équine

Très peu d'études ont évalué le rôle du NO chez le cheval. En 1993, une étude a révélé la production de NO à partir de l'endothélium des veines digitales chez le cheval (Bryant and Elliott 1994). Depuis, quelques études ont tenté de démontrer la production de NO ou l'expression des NOS par différentes cellules et tissus, avec ou sans stimulation. En effet, une expression accrue de la iNOS a été observée chez des chondrocytes équins stimulés avec de l'IL-1 $\beta$  recombinante équine (Tung, Venta et al. 2002), ou avec du LPS ou de l'IL-1 $\beta$  recombinante humaine (Freaan, Bryant et al. 1997). De plus, il a été démontré que les macrophages alvéolaires des chevaux pouvaient exprimer de la iNOS lorsque stimulés avec du LPS (Hammond, Hannon et al. 1999). Finalement, Costa *et al.* ont démontré qu'il y avait présence de NO dans le LBA ainsi que dans le plasma des chevaux. Cependant, la concentration de NO n'était pas significativement différente chez les chevaux normaux et chez les chevaux atteints d'obstruction pulmonaire associée au pâturage (Costa, Seahorn et al. 2001).

## 1.4 RÔLES PHYSIOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES

### 1.4.1 Endothélium vasculaire

L'utilisation d'inhibiteurs compétitifs pour la NOS entraîne la constriction des vaisseaux sanguins ainsi qu'une augmentation de la pression sanguine. Ce phénomène indique que l'effet vasodilatateur produit par le NO est essentiel pour la régulation de la pression et de la circulation sanguine. Plusieurs effets du NO sont modulés par le système de la guanylate cyclase. Il est maintenant bien établi que la vasodilatation engendrée par le NO ou par les donneurs de NO implique l'activation de la guanylate cyclase soluble avec une conversion subséquente de GTP en GMPc (Katsuki, Arnold et al. 1977). Dans cette cascade, le NO diffuse à partir des cellules de l'endothélium vers les muscles lisses vasculaires adjacents et active la guanylate cyclase soluble en se liant à la partie ferreuse du complexe hème et en déplaçant le fer hors du plan de l'anneau de porphyrine (Ignarro, Ballot et al. 1984; Ignarro 1989). Ce phénomène entraîne une augmentation de la concentration de GMPc menant à une relaxation vasculaire (Waldman and F. 1988). L'hémoglobine, qui est un inhibiteur puissant du NO se lie de façon similaire.

Pendant plusieurs années, la seule NOS connue dans les parois des vaisseaux sanguins était l'enzyme constitutive  $Ca^{2+}$  dépendante. Toutefois, des cellules endothéliales porcines mises en culture et stimulées avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$  démontrent l'expression d'une NO-synthase  $Ca^{2+}$  indépendante (Radomski, Palmer et al. 1990). L'induction de cette NO-synthase dans l'endothélium vasculaire et dans la couche vasculaire de muscle lisse était dépendante du temps, révélant qu'elle avait un mode d'action similaire à la iNOS (Radomski, Palmer et al. 1990).

### 1.4.2 Cellules immunitaires

#### 1.4.2 a) *Neutrophiles*

Les neutrophiles péritonéaux de rat stimulés avec du glycogène sécrètent un facteur qui engendre une relaxation des muscles lisses vasculaires (Rimele, Sturm et al. 1988) et augmente le niveau de GMPc dans le tissu (Lee, Faunce et al. 1988). Des études utilisant la chimiluminescence ont déterminé que le facteur relâché par les neutrophiles humains stimulés était bel et bien du NO (Wright, Mülsch et al. 1989).

La L-Canavanine, qui inhibe la formation de NO dans les macrophages, mais pas dans les cellules endothéliales, inhibe également la production de NO par les neutrophiles (McCall, Broughton-Smith et al. 1989). L'effet inhibiteur de la L-Canavanine et du L-NMMA requiert un temps de préincubation d'environ une heure en raison du temps d'absorption du produit par le neutrophile.

La présence de NOS dans les neutrophiles péritonéaux de rat a été confirmée par McCall (McCall, Feelisch et al. 1991 a). Cette enzyme possède les mêmes caractéristiques que celle retrouvée chez le macrophage, elle se situe donc dans le cytosol, est indépendante aux ions  $Ca^{2+}$  et est inductible (McCall, Palmer et al. 1991 b). La synthèse du NO par ces neutrophiles péritonéaux est augmentée par leurs stimulations avec des chimioattractants tels que le N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) et les leucotriènes B4 (McCall, Broughton-Smith et al. 1989). Un ajout de L-arginine n'affecte pas la production basale de NO, mais augmente la quantité de NO produit lorsque les neutrophiles sont stimulés avec du fMLP (Moncada, Palmer et al. 1991). Ce phénomène suggère que la quantité de L-arginine présente est suffisante pour la synthèse basale de NO, mais que ce substrat devient limitant lors d'une stimulation. Il est à noter que la production de NO par les neutrophiles peut être variable en fonction de l'espèce d'où proviennent ces cellules.



Le NO serait également impliqué dans l'interaction entre les leucocytes et la paroi des vaisseaux sanguins, engendrant l'inhibition de leur activation (Kubes, Suzuki et al. 1991). De plus, il inhibe la prolifération des cellules des muscles lisses et participe au contrôle homéostatique du système vasculaire (Garg and Hassid 1989).

Le rôle biologique de la production de NO par les neutrophiles reste à être élucidé. Pour l'instant, aucune information ne laisse croire que le NO produit par les neutrophiles pourrait avoir un effet majeur dans les pouvoirs cytotoxiques de ces cellules (Moncada, Palmer et al. 1991).

#### **1.4.2 b) *Macrophages***

Des études montrent que des lignées cellulaires de macrophages stimulées avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$ , synthétisent du nitrite et du nitrate, et que cette production est dépendante de la présence de L-arginine (Stuehr and Marletta 1987 a). La cytotoxicité des macrophages activés contre les cellules tumorales et les bactéries est également dépendante de la présence de L-arginine (Hibbs, Jr. et al. 1987 b).

La NO-synthase dans les macrophages est différente de celle retrouvée dans les cellules endothéliales, les plaquettes et le cerveau car elle n'est pas détectable chez des macrophages qui n'ont pas été activés par un agent comme du LPS ou une combinaison de LPS et de IFN- $\gamma$  (Stuehr and Marletta 1987 a) et requière la synthèse de protéine pour son expression (Marletta, Yoon et al. 1988). La présence de nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) et de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est observable 8h après stimulation et se poursuit jusqu'à épuisement du substrat ou jusqu'à la mort de la cellule (Stuehr and Marletta 1987 a).

La cascade signalitique L-arginine-monoxyde d'azote dans les macrophages constitue un mécanisme de défense primitif contre les microorganismes

intracellulaires ainsi que contre les pathogènes tels que les fungi et les helminthes (Moncada, Palmer et al. 1991).

#### **1.4.2 c) *Lymphocytes***

Kirk *et al.* ont démontré que des lymphocytes T murins clonés, lorsque stimulés avec de l'IL-2, pouvaient produire du NO (Kirk, Regan et al. 1990). Des lymphocytes T humains périphériques synthétisent également du NO pendant la prolifération mitogénique et celui-ci induirait la synthèse de l'ADN lymphocytaire (Efron, Kirk et al. 1991). Bien que peu d'études aient démontré la synthèse de NO par les lymphocytes, il est important de mentionner que ces cellules peuvent avoir un effet important dans la production de NO par les macrophages (Moilanen and Vapaatalo 1995). En effet, les cytokines produites par les lymphocytes activés peuvent induire ou supprimer la production de NO par les macrophages. Les lymphocytes Th1 synthétisent des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ , qui induisent la iNOS alors que les Th2 produisent des cytokines qui vont inhiber le signal telles que IL-4 et IL-10. Finalement, le NO produit par les macrophages activés peut inhiber la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  produits par les lymphocytes Th1 engendrant un processus de rétroaction négatif de la réponse immunitaire (Moilanen and Vapaatalo 1995).

#### **1.4.3 Plaquettes**

Le NO inhibe l'agrégation plaquettaire via un mécanisme GMP cyclique dépendant (Radomski, Palmer et al. 1987 a). La prostacycline et le NO agissent de concert afin d'inhiber l'agrégation des plaquettes en augmentant leur niveau d'AMP cyclique. Ils peuvent également désagréger les plaquettes (Radomski, Palmer et al. 1987 b), suggérant que la sécrétion de NO et de prostacycline par l'endothélium vasculaire a un effet de cytoprotection antithrombique qui est supérieur lorsqu'ils sont

réunis que lorsqu'ils sont produits indépendamment (Radomski, Palmer et al. 1987 b). Le NO inhibe également l'adhésion des plaquettes aux fibrilles de collagène ainsi qu'aux cellules endothéliales, processus modulé via le GMP cyclique (Radomski, Palmer et al. 1987 c).

Il a été démontré que les plaquettes génèrent également du NO, agissant comme un mécanisme de rétroaction négative permettant de réguler l'agrégation plaquettaire (Radomski, Palmer et al. 1990 a). Ainsi, l'agrégation plaquettaire *in vivo* peut être régulée tant par le NO produit par les plaquettes que par le NO et la prostacycline produits par l'endothélium vasculaire. L'action combinée de ces deux médiateurs peut alors supprimer l'élévation de la concentration des ions  $Ca^{2+}$  intracellulaire et engendrer ainsi une très forte inhibition de l'agrégation des plaquettes (Radomski, Palmer et al. 1987 c). La formation de NO à partir de la L-arginine dans le cytosol des plaquettes est dépendante de la concentration des ions  $Ca^{2+}$ , démontrant que la NOS des plaquettes, tout comme celle de l'épithélium vasculaire, est calcium-dépendante (Radomski, Palmer et al. 1987 c).

#### 1.4.4 Système nerveux

Il a été démontré que l'oxyde nitrique joue un rôle dans le système nerveux central. Miki *et al* ont découvert que le NO stimulait la guanylate cyclase soluble dans des homogénats de cortex cérébral de souris (Miki, Kawabe et al. 1977). En 1982, l'activateur endogène de la guanylate cyclase soluble dans le cerveau a été identifié comme étant la L-arginine (Deguchi and Yoshioka 1982). Il a par la suite été démontré que l'ajout de L-arginine à du cytosol synaptosomal de rat, en présence de NADPH engendrait la formation de NO et de citrulline, accompagnée de la stimulation de la guanylate cyclase soluble (Knowles, Palacios et al. 1989).

De nombreuses preuves semblent indiquer que le NO joue un rôle important dans le phénomène de mémorisation. Une étude *in vitro* a démontré que du NO est

sécrété d'une source post-synaptique puis agit de façon pré-synaptique sur un ou plusieurs neurones, suite à la stimulation d'un récepteur spécifique. Ceci entraîne une augmentation de la sécrétion de glutamate engendrant une potentiation à long terme, phénomène étant lié à la formation de la mémoire (Collingridge, Kehl et al. 1983). D'autres études chez les animaux suggèrent que le NO est impliqué dans le phénomène de mémorisation car l'inhibition de la synthèse de NO altère le comportement d'apprentissage (Chapman, Atkins et al. 1992).

De plus, le NO est également retrouvé dans le système nerveux périphérique. Il contribue à la transmission sensorielle (Moncada 1992) et est un transmetteur ou un modulateur des nerfs non-adrenergiques, non-cholinergiques (Rand 1992).

## **1.5 RÔLES DANS LES PROCESSUS IMMUNITAIRES**

L'oxyde nitrique est un important médiateur des processus homéostatiques dans les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte. Des modifications dans sa production ou son action contribuent à son dysfonctionnement. (Moncada and Higgs 1993).

### *1.5.1 Non-spécifiques*

L'oxyde nitrique est un médiateur très important de la réponse inflammatoire innée. Il est impliqué dans diverses réponses à des infections ainsi que lié à des dommages tissulaires. La résistance aux bactéries, virus, parasites et fungi est souvent conférée à la iNOS, elle-même induite par diverses cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, d'autres maladies telles que l'influenza, la pneumonie et les infections intestinales causées par des parasites sont exacerbées par la production de NO engendrant des dommages tissulaires.

### 1.5.1 a) *Infections*

Bien que les effets bénéfiques du NO sur le système immunitaire soient bien établis entre les différents types d'infections (bactérienne, fongique, parasitaire), des événements mitigés surviennent au sujet de l'action du NO lors d'infection virale. Deux mécanismes suscitent les effets néfastes engendrés par le NO lors d'infection virale : la formation de formes réactives de l'oxygène et la mutagénèse chimique. Une étude utilisant un modèle animal knock-out a démontré que la iNOS est la principale source de NO durant les infections virales (Akaike, Noguchi et al. 1996).

L'induction de la iNOS lors d'infection virale est indirectement modulée par les cytokines (principalement l'IFN- $\gamma$ ) et directement par les constituants des virus (Akaike, Noguchi et al. 1996). De plus, la iNOS peut être activée par différentes cascades indépendantes des cytokines pro-inflammatoires tel que par certains virus comme le VIH via son composé de surface gp41 (Hori, Burd et al. 1999).

Le processus de destruction bactérienne impliquant le NO est divisé en deux étapes : tout d'abord, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  activent les macrophages, ce qui promeut l'expression de la iNOS et donc la synthèse de NO. Durant la phagocytose, l'augmentation de l'explosion oxydative représente la seconde étape. Les infections bactériennes mènent à l'induction de la xanthine oxydase (XO) et de la iNOS. Le NO expose ses effets cytotoxiques et cytostatiques en combinaison avec d'autres agents produits par le macrophage tel que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'OH<sup>-</sup>. Plusieurs interactions entre ces formes réactives de l'oxygène surviennent lors des réactions immunitaires contre des bactéries. Des anions superoxydes, synthétisés par la XO et du NO peuvent réagir ensemble afin de produire du peroxyde d'azote, radical pouvant engendrer des dommages à l'ADN (Maeda and Akaike 1998).

### 1.5.2 L'asthme humain

L'asthme est caractérisé par une inflammation des voies respiratoires, de l'activation des mastocytes et des macrophages ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles. De plus, les lymphocytes Th seraient activés dans les muqueuses des voies respiratoires avec une prolifération des Th2 et l'expression de l'ARN des IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13. Barnes et Liew ont proposé une hypothèse impliquant le NO dans l'asthme : le NO produit par les cellules épithéliales des voies respiratoires et possiblement par les macrophages, les Th1 et les mastocytes, joue un rôle important dans l'amplification et la perpétuation de la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes Th2 (Barnes and Liew 1995). Il a été mentionné plutôt, que la iNOS pouvait être induite chez les cellules épithéliales lors de l'exposition à diverses cytokines proinflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  produits par les macrophages, et par l'IFN- $\gamma$ , produit par les Th1. L'IFN- $\gamma$  a un effet inhibiteur sur l'expression des cytokines des lymphocytes Th2 des poumons. La grande quantité de NO produit par l'épithélium des voies respiratoires supprime les Th1 et diminue donc le niveau d'IFN- $\gamma$ , menant à la prolifération des Th2. Les lymphocytes Th2 produisent alors diverses cytokines telles que l'IL-10, qui inhibe les Th1, l'IL-4, qui est responsable de la production locale d'IgE et de l'expression des VCAM-1 sur les cellules endothéliales vasculaires bronchiques et l'IL-5, qui est importante dans le recrutement des éosinophiles dans les voies respiratoires (Barnes and Liew 1995).

## 1.6 MÉTABOLISME DE L'OXYDE NITRIQUE

L'oxyde nitrique est un gaz incolore qui, en l'absence d'oxygène, se dissout dans l'eau, ce qui le rend très stable. Dans l'air, le NO réagit rapidement avec l'oxygène afin de former du dioxyde d'azote, gaz pouvant induire des dommages tissulaires (Moncada and Higgs 1993). À de faible concentration, le NO est

relativement stable même en présence d'oxygène. Cette stabilité, ajoutée à l'affinité très élevée du NO pour l'hémoglobine (3000 fois plus élevée que pour l'oxygène) permet l'utilisation du NO par inhalation, puisqu'il se fixera à l'hémoglobine avant de se lier à l'oxygène (Borland and Higenbottam 1989).

Le NO est oxydé en nitrite, dans l'eau et le plasma et y est stable pour plusieurs heures. Toutefois, le nitrite est rapidement transformé en nitrate dans le sang (Moncada and Higgs 1993). Ainsi, la concentration basale de nitrite dans le sang est très faible, alors que celle de nitrate est cent fois plus élevée (30  $\mu\text{mol/l}$ ) (Green, Wagner et al. 1982).

## **2. LES NEUTROPHILES**

### **2.1 GÉNÉRALITÉS**

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont les cellules constituant la première ligne de défense du système immunitaire lors de la réponse inflammatoire engendrée par divers antigènes. Les neutrophiles sanguins possèdent un diamètre pouvant varier entre 12 et 14  $\mu\text{m}$ . Leur noyau est plurilobé. Lorsqu'ils sont matures, il est généralement possible d'observer cinq lobes reliés par de fins filaments de matériel nucléaire, tandis que les cellules plus jeunes possèdent un noyau moins segmenté (Wheater, Young et al. 2001). La lobulation sera marquée ou non, dépendamment des espèces, ce qui explique que l'indentation du noyau des neutrophiles matures des chevaux est plus évidente que celle chez les chiens et les chats (Bertram 1985). Le cytoplasme des neutrophiles contient divers types de granules (voir tableau II page 24). Tout d'abord, de fines granulations pourpres nommées granulations azurophiles qui correspondent à de grands lysosomes. Elles sont également connues sous le nom de granulations primaires puisqu'elles sont les premières à apparaître lors de la différenciation des neutrophiles. Elles contiennent, entre autres, des hydrolases acides lysosomales ainsi que plusieurs agents antimicrobiens comme la myéloperoxydase. Les granulations les plus nombreuses dans le cytoplasme sont les granulations secondaires, plus fines que les premières et spécifiques aux neutrophiles. Ces granulations sécrètent des substances impliquées dans la réaction inflammatoire aiguë, comme des médiateurs de l'inflammation et des activateurs du complément. Finalement, les petites granulations tertiaires contiennent des enzymes, telle la gélatinase, qui sont libérées dans l'espace extracellulaire (Wheater, Young et al. 2001).



Le cycle de vie des neutrophiles débute dans la moelle osseuse, se poursuit dans la circulation sanguine et se termine dans les tissus. Ils ont pour origine des cellules souches de types myéloïdes et ils se différencient dans la moelle osseuse sur une période de 14 jours (Baehner 2000). Divers facteurs de croissance hématopoïétique tels que le facteur stimulant des granulocytes (G-CSF) et le facteur stimulant des granulocytes et des macrophages (GM-CSF) engendrent une production leucocytaire estimée entre  $10^8$  et  $10^{11}$  cellules par jour, dépendamment des techniques de mesure utilisées (Baehner 2000). Dans la circulation, les neutrophiles ont une demi-vie de 6 à 9 heures. Ils représentent plus de 50% des leucocytes circulants et plus de 90% des phagocytes. Ils ont la possibilité de passer de la circulation sanguine à l'état marginalisé et de revenir dans la circulation. Les neutrophiles marginalisés sont emmagasinés dans les capillaires de certains tissus, particulièrement dans les poumons (Boggs 1967). Ce grand bassin de cellules marginalisées permet leur mobilisation rapide dans les tissus périphériques lors d'une infection.

Pendant de nombreuses années, on considérait que le rôle principal des neutrophiles dans la réponse inflammatoire et immunitaire se résumait à la phagocytose et à la destruction des bactéries via la production de formes réactives de l'oxygène et de la sécrétion d'enzymes lytiques emmagasinées dans les granules. Depuis 1992, les travaux de recherche ont permis de démontrer que les neutrophiles avaient la capacité d'exprimer, de façon constitutive ou suivant une stimulation appropriée, de l'ARNm pour une grande variété de protéines, telles que des cytokines, impliquées dans leur fonction effectrice (Lloyd and Oppenheim 1992).

**Tableau II : Principaux constituants des granules des neutrophiles**

<b>Granules azurophiles (primaires)</b>	<b>Granules spécifiques (secondaires)</b>	<b>Granules gélatinases (tertiaires)</b>
Myéloperoxidase	Collagénase	Gélatinase
Hydrolases acides	Gélatinase	Lysozyme
Protéine bactéricide inductrice de perméabilité	Lactoferrine	
Défensines	Lysosyme	
Élastase	Protéine de liaison pour la vitamine B-12	
Lysozymes	Phosphatase alcaline	

## 2.2 RÔLE DANS LA RÉACTION IMMUNITAIRE

L'inflammation neutrophilique est une forme de réponse inflammatoire caractérisée par l'infiltration de neutrophiles dans les tissus infectés ou inflammés. Elle peut être représentée lors d'une infection tissulaire engendrée par une bactérie extracellulaire (Babior 1984). Toutefois, plusieurs maladies non infectieuses sont caractérisées par un recrutement extra vasculaire de neutrophiles (Malech and Gallin 1987). Ces maladies incluent les maladies obstructives pulmonaires chroniques, l'asthme, le syndrome de détresse respiratoire, les glomérulo-néphridites, la phase aiguë de l'arthrite rhumatoïde, les colites ulcéreuses, certaines dermatoses telles que le psoriasis et les vasculites. Les neutrophiles joueraient probablement un rôle crucial dans le développement de dommage tissulaire pouvant entraîner une destruction irréversible de l'architecture normale des tissus et ainsi qu'un dysfonctionnement de l'organe dans ces maladies (Weiss 1989).

### 2.2.1 Adhésion leucocytaire

La capacité d'adhérer, soit à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire, est une propriété fondamentale requise pour le bon fonctionnement des cellules. La migration cellulaire, tant lors du développement embryonnaire que dans diverses situations dans l'organisme mature, requiert l'adhérence (Brown and Lindberg 1996). L'immuno-surveillance n'est possible que si les leucocytes sont capables de se déplacer à travers le corps, reconnaissant les endroits où il y a perturbation, pour ensuite s'y accumuler rapidement. De plus, ces cellules doivent quitter le site ou être éliminées lors de la résolution de l'infection (Brown and Lindberg 1996).

Lorsque les barrières physiques telles que la peau et les muqueuses sont transgressées par un élément pathogène, la réponse immunitaire de l'hôte requiert la mobilisation de leucocytes tissulaires (macrophages et mastocytes) ainsi que le recrutement de leucocytes sanguins. Les polymorphonucléaires neutrophiles sont les premières cellules à migrer dans le tissu, suivies par les phagocytes mononucléés et par les lymphocytes, quelques heures plus tard.

#### 2.2.1 a) *Molécules d'adhésion*

Le processus de migration vers un foyer d'infection ou d'inflammation requiert divers événements. Tout d'abord, les leucocytes circulants dans le sang doivent reconnaître un dommage tissulaire. Ensuite, ils interagissent avec l'endothélium de ce site, puis ils migrent à travers la barrière endothéliale; phénomène nommé migration transendothéliale. Finalement, les leucocytes doivent avoir la capacité de se déplacer à travers la matrice extracellulaire, sous l'endothélium, afin de rejoindre le foyer d'infection extra-vasculaire. Afin d'initier cette série d'événements, les leucocytes et les cellules endothéliales synthétisent un grand nombre de molécules, classées en trois groupes : les intégrines, les sélectines

et les membres de la super famille des immunoglobulines. Ces molécules de la membrane plasmique se reconnaissent l'une l'autre. Quelques unes sont exprimées de façon constitutive sur la membrane plasmique des leucocytes et d'autres sont synthétisées ou exprimées par l'endothélium, seulement aux sites d'inflammation.

### 2.2.1 a I) *Intégrines*

Les intégrines sont une famille de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques exprimées par les leucocytes et impliquées dans la régulation de l'adhésion entre deux cellules ou entre une cellule et l'endothélium (Hynes 1987). Les deux chaînes des intégrines connues sous les noms  $\alpha$  et  $\beta$  sont le produit de deux gènes distincts. Vingt-deux différentes intégrines sont exprimées suite à la combinaison d'un des 14 gènes  $\alpha$  avec l'un des huit gènes  $\beta$  (Hynes 1992). Les  $\beta_2$ -intégrines présentes sur les leucocytes regroupent trois différentes intégrines soit CD11a, CD11b et CD11c. Celles-ci se lient à une sous-unité  $\alpha$  commune, CD18.

### 2.2.1 a II) *Sélectines*

Les sélectines sont une famille de glycoprotéines possédant un domaine distal semblable à une lectine (lectines transmembranaires de type 1) ce qui permet à ces molécules de se lier à des groupes glucidiques spécifiques. Elles sont exprimées sur les leucocytes ou sur l'endothélium (Tedder, Steeber et al. 1995). La famille des sélectines est composée de trois membres, le premier étant la L-sélectine (CD62L), exprimée sur les leucocytes, le second, la P-sélectine (CD62P) et le troisième, la E-sélectine (CD62E), ces deux dernières étant exprimées sur l'endothélium. La L-sélectine est exprimée de façon constitutive dans la grande majorité des leucocytes alors que la E-sélectine est seulement synthétisée par l'endothélium en réponse à diverses cytokines, la plus efficace étant l'IFN- $\gamma$  (Bevilacqua, Stenglein et al. 1989).

La P-sélectine, quant à elle, est synthétisée constitutivement par plusieurs cellules endothéliales et par les plaquettes, mais elle n'est pas exprimée à la surface de la membrane plasmique. Elle est conservée dans les corps de Weibel-Palade (granules de stockage de la cellule endothéliale), qui sont rapidement mobilisés à la membrane plasmique (5 à 15 minutes), suite à un stimulus inflammatoire physiologique tel que l'histamine, la thrombine et le facteur C5a. Ce phénomène permet aux P-sélectines d'être synthétisées puis exprimées à la surface des cellules endothéliales dans un délai de 2 heures (McEver, Beckstead et al. 1989). Les P et E-sélectines interagissent avec le *sulfate-sialyl-Lewis<sup>x</sup>* (s-Le<sup>x</sup>) qui est présent à la surface des neutrophiles.

### 2.2.1 a III) *Membres de la famille des immunoglobulines (Ig)*

Les membres de la famille des Ig sont impliqués dans l'adhésion cellulaire chez diverses cellules. Sur les cellules endothéliales, plusieurs d'entre elles sont reconnues par les intégrines des leucocytes. La molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1, CD54) et ICAM-2 (CD102) sont toutes deux reconnues par LFA-1 ( $\alpha_L:\beta_2$ ), et Mac1 ( $\alpha_m:\beta_2$ ) se lie également à ICAM-1 (Springer 1990). La molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1, CD106) est un ligand pour  $\alpha_4:\beta_1$  sur les monocytes et les lymphocytes.

Deux membres de la famille des Ig ont été démontrés dans le processus de migration trans-endothéliale, ce sont la molécule d'adhésion des plaquettes (PECAM, CD31) et la protéine associée à l'intégrine (IAP, CD47). PECAM est exprimée à la jonction entre les cellules de l'endothélium ainsi que sur les leucocytes, et peut moduler l'adhésion entre les cellules. L'IAP est présente sur les fibroblastes, les plaquettes, les érythrocytes, les neurones, ainsi que sur les leucocytes et l'endothélium (Reinhold, Lindberg et al. 1995).

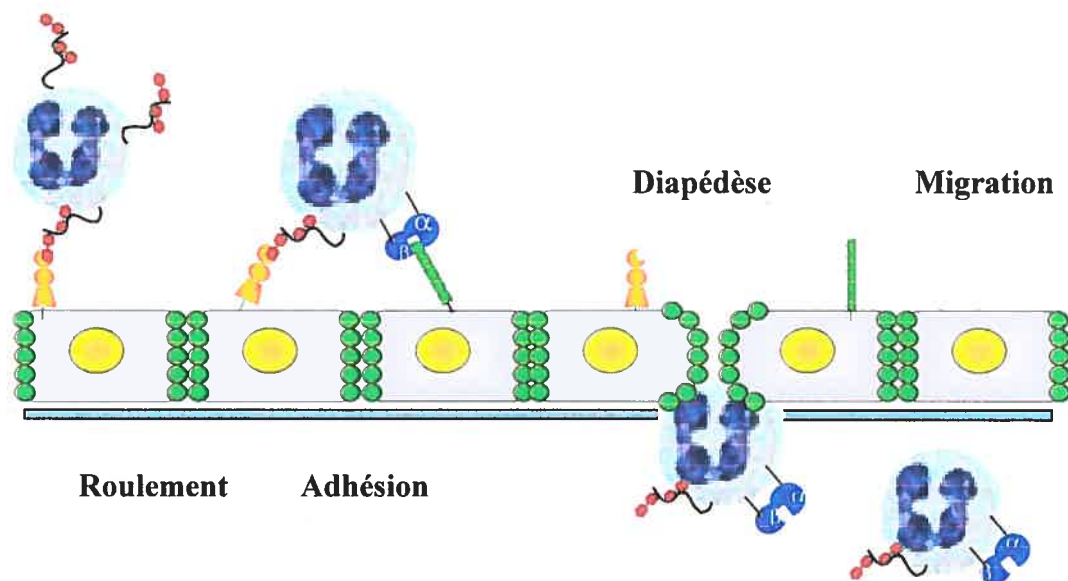
### 2.2.1 b) *Modèle de migration trans-endothéliale*

Le recrutement de neutrophiles à l'extérieur des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire est un processus se déroulant en plusieurs étapes impliquant diverses interactions entre les leucocytes se déplaçant rapidement dans la circulation sanguine et les cellules de l'épithélium vasculaire. Il requiert l'intervention d'un grand nombre de molécules d'adhésion cellulaires, tant sur les neutrophiles que sur les cellules endothéliales, ainsi que la sécrétion de différents médiateurs proinflammatoires tels que des amines vasoactives, des cytokines et des chimiotaxines (voir figure 3 page 29 et tableau III page 30).

La première étape de la réponse inflammatoire est probablement la production locale de signaux chimiques menant à l'activation de l'endothélium vasculaire. Ce phénomène se décrit par la transformation de la paroi endothéliale normale en une surface adhérente permettant l'ancrage des neutrophiles circulants (Cronstein and Weissmann 1993). La sécrétion locale d'histamine par les mastocytes périvasculaires est un des signaux inflammatoires initiaux (Cronstein and Weissmann 1993). En effet, elle permet une translocation rapide des P-sélectines contenues dans les corps de Weibel-Palade vers la surface des cellules endothéliales (Bevilacqua and Nelson 1993). De plus, les cellules endothéliales synthétisent et expriment les E-sélectines en présence de TNF et d'IL-1. Les E-sélectine et P-sélectine, ainsi que L-sélectine sont présentes de façon constitutive sur les neutrophiles circulants et interagissent avec les oligosaccharides présents sur les membranes des neutrophiles et des cellules endothéliales (Bevilacqua and Nelson 1993).


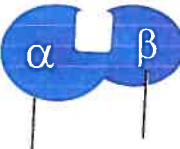

### 2.2.1 b I) *Marginalisation*

La transmigration des neutrophiles s'effectue majoritairement dans les veinules post-capillaires, dans la circulation systémique et dans les capillaires de la circulation pulmonaire (Downey, Worthen et al. 1993). Leur passage dans le compartiment extra-vasculaire est modulé par une combinaison de processus mécaniques, chimiques et moléculaires, ordonnés de façon précise dans le temps. La première étape est la marginalisation, engendrant le déplacement des neutrophiles du centre des vaisseaux sanguins vers leur périphérie. Les érythrocytes quant à eux, se déplacent plus rapidement, spécialement au centre des vaisseaux, et poussent les neutrophiles vers la périphérie (Schmid-Schonbein, Usami et al. 1980). L'importance des érythrocytes dans la marginalisation des neutrophiles a été démontrée dans un modèle de perfusion mésentérique chez le rat. Effectivement, dans cette étude, aucune marginalisation des leucocytes n'a été démontrée en l'absence d'érythrocytes (Blixt, Jonsson et al. 1985).



**Figure 3 : Représentation de la migration trans-endothéliale des neutrophiles**

**Tableau III : Molécules d'adhésion dans le processus de migration trans-endothéliale**

		Nom	Cellules	Ligand
<b>Sélectines</b> Lient les glucides Initient l'interaction leucocytes-cellules endothéliales	 E-sélectine	<b>P-sélectine</b> (PADGEM, CD62P)	Endothélium activé Plaquettes	PSGL-1 s-Le <sup>x</sup>
		<b>E-sélectine</b> (ELAM-1, D62E)	Endothélium activé	s-Le <sup>x</sup>
<b>Intégrines</b> Lient les molécules d'adhésion cellulaire et la matrice extracellulaire Adhésion forte	 LFA-1	$\alpha_L : \beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18)	Monocytes Lymphocytes T Macrophages Neutrophiles $\phi$ dendritiques	ICAMs
		$\alpha_M : \beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	Neutrophiles Monocytes Macrophages	ICAM-1, iC3b, fibrinogène
		$\alpha_X : \beta_2$ (CR4, p150.95, CD11c/CD18)	$\phi$ dendritiques Macrophages Neutrophiles	iC3b
		$\alpha_5 : \beta_1$ (VLA-5, CD49d, CD29)	Monocytes Macrophages	Fibronectine
<b>Super famille des            Immunoglobuline</b> Différents rôles dans l'adhésion cellulaire Ligands pour les intégrines	 ICAM-1	<b>ICAM-1</b> (CD54)	Endothélium activé	LFA-1 Mac-1
		<b>ICAM-2</b> (CD102)	Endothélium au repos $\phi$ dendritiques	LFA-1
		<b>VCAM-1</b> (CD106)	Endothélium activé	VLA-4
		<b>PECAM-1</b> (CD31)	Leucocytes activés Jonctions entre les $\phi$ endothéliales	CD31



### 2.2.1 b II) Roulement

La première interaction entre les neutrophiles et l'endothélium à un site d'infection est une liaison de faible affinité permettant de réduire leur vitesse et ainsi, leur débit normal dans le sang. Ce phénomène est généralement produit par l'interaction entre diverses sélectines et dans certains cas par l' $\alpha_4$ -intégrine, ce qui permet aux neutrophiles de rouler le long de la paroi des vaisseaux sanguins. Les sélectines endothéliales se lient au s-Le<sup>x</sup> exprimé par les neutrophiles. Le ligand prédominant pour la P-sélectine est le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) (Yang, Hirata et al. 1999). Les ligands pour la L-sélectine sont des déterminants glucidiques sialylés qui sont liés aux molécules de type *mucine-like* sur les cellules endothéliales activées (Springer 1994). Les interactions entre les sélectines et leurs ligands sont caractérisées par une capacité élevée à créer des liens entre eux ainsi qu'à se désunir permettant ainsi le roulement des neutrophiles. Les signaux perçus tels que l'IL-8 (chimioattractant), le PAF, la protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1), le LPS ou diverses perturbations de l'homéostasie, lorsque les leucocytes roulent, provoquent leur activation et permettent d'enclencher le processus d'adhésion ferme. Ces molécules chimiotactiques, présentées à la surface des cellules endothéliales, interagissent avec une protéine G spécifique couplée à un récepteur exprimé par les neutrophiles. Elles peuvent également guider les neutrophiles vers les sites inflammatoires (Foxman, Campbell et al. 1997). Une déficience dans les sélectines ou leurs ligands affectant le processus de roulement peut gravement entraver la migration des cellules leucocytaires vers les tissus (Tedder, Steeber et al. 1995) tel que dans la déficience d'adhésion leucocytaire type 2 (LAD II).

### 2.2.1 b III) Adhésion

Lors de la seconde étape du processus de migration, les récepteurs à sept domaines transmembranaires engendrent l'activation des intégrines, c'est-à-dire,

qu'ils génèrent un état de haute affinité des molécules d'adhésion, entraînant l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium. Ce phénomène est modulé par les  $\beta_2$  et  $\alpha_4$ -intégrines présentes sur les neutrophiles. Les CD11a-CD18 (LFA-1) et CD11b-CD18 (Mac-1) interagissent avec les molécules d'adhésion ICAM-1, alors que l'ICAM-2 ne se lie qu'avec CD11a (Zimmerman, Prescott et al. 1993). Ceci explique que les patients souffrant de LAD de type 1 ont des neutrophiles qui peuvent rouler mais qui sont incapables de coller puis migrer à travers la membrane puisqu'ils possèdent un CD18 négatif. Deux facteurs majeurs contribuent au processus d'adhésion : le premier est l'expression de l'ICAM-1 sur la surface des cellules endothéliales. Le second facteur est l'exposition et l'activation des molécules CD11b-CD18, qui sont normalement emmagasinées dans les granules myéloperoxydases négatifs des neutrophiles au repos. Cette activation est en fait l'induction de changements de la conformation des molécules d'adhésion afin d'augmenter leur affinité (Pardi 1994). On pense que ce phénomène suit l'activation des neutrophiles par des signaux générés à travers les L-sélectines lors du roulement et/ou par le facteur activateur de plaquette (PAF) et l'IL-8, synthétisés et exposés à la surface de l'endothélium activé (Zimmerman, Prescott et al. 1993). Lors de cette activation, les neutrophiles passent de cellules en roulement présentatrices de L-sélectines à des cellules présentatrices de CD11b-CD18 et adhèrent fermement à l'ICAM-1 des cellules endothéliales. Cette adhésion peut être inhibée par la production de NO engendrée par les cellules endothéliales en réponse à des cytokines et/ou à du LPS (Kubes, Suzuki et al. 1991; Nathan 1992).

#### 2.2.1 b IV) *Diapédèse*

L'étape suivante est la migration des leucocytes à travers les jonctions intercellulaires de l'endothélium (Burns, Walker et al. 1997). Les chimiotaxines associées à l'endothélium, PAF et IL-8, contribuent à la diapédèse en guidant les neutrophiles à travers la couche cellulaire de l'endothélium (Baggiolini, Walz et al.

1989). La migration transendothéliale des neutrophiles est un mécanisme très complexe qui requiert une modulation de l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales ainsi que des modifications dans l'arrangement du cytosquelette des neutrophiles en mouvement. La migration des neutrophiles à travers les tissus subendothéliaux impliquerait la digestion de la membrane basale des vaisseaux et des composants de la matrice extra-cellulaire par des sérines protéinases telles que la cathepsine G, l'élastase et la protéinase 3, exprimées sur la surface des cellules en migration (Owen, Campbell et al. 1995 a; Owen, Campbell et al. 1995 b). En raison de leur localisation sur la membrane cellulaire, ces enzymes échappent à l'inactivation par des inhibiteurs de protéase et miment des activateurs de plasminogène de type urokinase et des plasmines, exprimées sur les fibroblastes et sur les macrophages afin de favoriser la migration à travers les caillots de fibrine et les tissus (Pollanen, Saksela et al. 1987).

La molécule d'adhésion plaquette-cellules endothéliales (PECAM-1, CD31) est également présente dans le processus de diapédèse. Elle est exprimée constitutivement et est présente sur le pourtour des cellules endothéliales ainsi que sur les neutrophiles, certains lymphocytes T, les monocytes et les plaquettes. L'ajout d'anticorps monoclonaux afin de bloquer l'action de PECAM-1 engendre une augmentation de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales inhibant ainsi la diapédèse (Muller, Weigl et al. 1993; Berman and Muller 1995).

### *2.2.1 b V) Migration*

Il est finalement bien établi que la migration est dirigée par des gradients de chimiotaxines et de chimiokines produites localement (Baggiolini, Walz et al. 1989). Ceci comprend le fragment C5a du complément, généré lors de l'activation du complément par des peptides tel que fMLP engendré par des bactéries ainsi que deux lipides bio-actifs; PAF, produit par les cellules endothéliales et les macrophages et les leucotriènes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), produits par les macrophages. De plus, une série de

chimiokines de la famille du super gène CXC sont importantes pour la migration des neutrophiles à travers l'espace extravasculaire en raison de leur résistance à l'inactivation d'oxydants ou d'enzymes hydrolytiques (Baggiolini, Walz et al. 1989). L'IL-8, par exemple, qui est produit par les macrophages, les cellules endothéliales, épithéliales et les neutrophiles sur les lieux de l'infection, se lie aux protéoglycans de la matrice extracellulaire. Elle forme ainsi un gradient de concentration que peuvent suivre les neutrophiles afin de se rendre au foyer d'infection (Janeway, Travers et al. 2001).

### 2.2.2 Activation leucocytaire au site d'inflammation

Un autre rôle joué par les récepteurs des intégrines des neutrophiles est de signaler une modification dans le phénotype de ces cellules (activation leucocytaire). Lorsque les cellules phagocytaires circulent dans le sang et la lymphe, elles sont quiescentes. Leurs activités métaboliques et de synthèse sont faibles et elles ont de minces capacités à adhérer et à phagocyter. Toutefois, le phénotype des cellules sur un site d'inflammation est très différent. Leurs activités métaboliques et de synthèse sont actives, elles sont très adhérentes et destructrices, tant pour les agents pathogènes que pour les tissus de l'hôte, par la production d'enzymes protéolytiques et de formes réactives de l'oxygène. Plusieurs médiateurs inflammatoires peuvent signaler cette modification phénotypique, mais ce sont les protéines de la matrice extracellulaire qui sont le plus efficace. En plus d'être activés, les neutrophiles peuvent être amorcés afin d'engendrer une réponse plus forte ou exagérée à un stimulus activateur. Ce phénomène est défini par l'amplification de l'activité oxydative des neutrophiles en réponse à un stimulus activateur suivant l'exposition à un agent d'amorçage (Botha, Moore et al. 1995). Divers médiateurs peuvent entraîner la suractivation tels que l'ATP, PAF, IL-8, IL-6, LPS et LTB4 (Seely, Pascual et al. 2003).

### 2.2.3 Activité anti-microbienne

Le neutrophile est le principal phagocyte présent aux sites inflammatoires, il a pour fonction de détruire et d'ingérer les agents pathogènes dans la circulation sanguine et dans les tissus lui conférant ainsi un rôle important dans l'immunité non-spécifique. Toutefois, les capacités destructrices du leucocyte peuvent entraîner des dommages chez l'hôte, phénomène perçu dans plusieurs maladies telles que l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de détresse respiratoire et les colites ulcéreuses (Weiss 1989).

Les toxines produites par les neutrophiles sont divisées en deux groupes en fonction de leur localisation à l'intérieur de la cellule : soit dans les granules intracellulaires ou dans la membrane plasmique (Weiss 1989). Il existe au moins trois classes de granules intracellulaires contenant des peptides anti-microbiens, des protéines et des enzymes telles que de l'élastase, des protéinases et des myéloperoxydases (Borregaard, Lollike et al. 1993). De plus, le NADPH oxydase est activé dans la membrane et convertit l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ), processus portant le nom d'activation oxydative. La majorité de l' $O_2^-$  est dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L'acide hypochlorique est formé lorsque la myéloperoxydase oxyde le chlore en présence de  $H_2O_2$ . En plus de l'effet toxique direct de l' $O_2^-$ , des enzymes protéolytiques et de l'acide hypochlorique, les dommages tissulaires peuvent également survenir lors de la combinaison de l' $H_2O_2$  avec le fer réducteur à l'intérieur des cellules endothéliales, formant le radical hydroxyl (Varani and Ward 1994). Les réactifs azotés incluant le NO, agissent indépendamment et en synergie avec les formes réactives de l'oxygène pour créer des agents cytotoxiques secondaires (Smith 1994).

#### 2.2.4 Rôle du neutrophile dans le souffle

Le souffle est une maladie pulmonaire chronique fréquemment observée chez le cheval gardé en stabulation (Beech 1991; Derksen 1991). Cette maladie est caractérisée par une obstruction et une hyper-réactivité bronchique, une surproduction de mucus et une inflammation des voies respiratoires profondes (Robinson, Olszewski et al. 2000; Robinson 2001) associée à une neutrophilie pulmonaire (Derksen 1993). Il existe une grande variabilité individuelle quant à l'importance de cette neutrophilie. On connaît encore mal le rôle exact du neutrophile dans la maladie et les différents stimuli aboutissant à la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux atteints du souffle ne sont pas encore clairement définis. L'exposition des chevaux atteints du souffle au foin et à la paille aboutit à l'activation des neutrophiles circulants, par un ou plusieurs facteurs, traduite par l'augmentation du nombre d'intégrines de surface ou de leur affinité pour son récepteur. La nature de ces facteurs et leur origine restent à définir (Marr, Lees et al. 2002). Des études récentes rapportent que certaines cytokines pro-inflammatoires pourraient jouer un rôle significatif dans la neutrophilie pulmonaire. Il a été démontré que les cellules inflammatoires présentes dans les poumons des chevaux atteints de souffle ont un profil cytokinique de type Th2, avec une augmentation de l'expression de l'IL-4, l'IL-5 et une diminution de l'expression de l'IFN-gamma (Lavoie, Maghni et al. 2001). Comme mentionné précédemment, le NO peut jouer un rôle dans l'activation, l'adhésion et la modulation du neutrophile sanguin. Chez le cheval, le rôle du NO n'a pas été exploré.

### 2.2.5 NO et recrutement leucocytaire

#### 2.2.5 a) **NO produit constitutivement et recrutement leucocytaire**

La production incessante de faible quantité de NO par la eNOS des cellules endothéliales est essentielle pour la régulation du tonus vasculaire et la perfusion des tissus tel que mentionné plus haut (Ignarro, Byrns et al. 1987). L'inhibition de cette enzyme par la L-NAME a été utilisée afin de déterminer le rôle du NO produit constitutivement dans la régulation des interactions entre les cellules de l'endothélium et les leucocytes (Kubes, Suzuki et al. 1991). Il a été démontré que l'inhibition de la production du NO engendrait une grande augmentation dans le nombre des neutrophiles adhérents, au niveau de la circulation sanguine mésentérique chez le chat. Une autre étude a démontré chez le rat que la L-NAME augmentait le roulement des neutrophiles (Davenpeck, Gauthier et al. 1994). Ces observations dénotent que le NO, produit de façon constitutive par les cellules endothéliales, a un effet anti-inflammatoire, car il permet d'inhiber ou de limiter l'adhésion et le roulement des neutrophiles sur l'endothélium. Des recherches subséquentes, effectuées sur différents types de tissus tel que le foie, les poumons, le cœur et les muscles squelettiques, indiquent que ce phénomène est commun dans la microcirculation sanguine (Hickey 2001). L'inhibition de la production de NO, lors d'exposition à du LPS ou à du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exacerbe le recrutement leucocytaire, démontrant qu'il agit comme régulateur dans le recrutement lors de certains types de réponses inflammatoires (Johnston, Kanwar et al. 1996).

#### 2.2.5 b) **Effet du NO sur l'adhésion leucocytaire**

Plusieurs études ont examiné les effets du NO produit par la iNOS à l'aide de systèmes d'adhésions *in vitro*. Cartwright *et al.* ont créé une lignée cellulaire de

macrophages murins qui exprimaient les oligonucléotides sens ou antisens pour la iNOS murine (Cartwright, Johnstone et al. 1997). Suivant une stimulation avec du LPS, les cellules exprimant la iNOS antisens produisaient significativement moins de protéine iNOS et de NO que les cellules ayant les oligonucléotides sens (Cartwright, Johnstone et al. 1997). De plus, les cellules possédant la iNOS antisens pouvaient adhérer à l'endothélium beaucoup plus facilement que les autres. Ces observations suggèrent que le NO produit par la iNOS peut réguler l'adhésion de lignées cellulaires de macrophages à l'endothélium (Cartwright, Johnstone et al. 1997).

La production de NO peut moduler le débit sanguin grâce à ses effets vasodilatateurs. La vasodilatation ainsi créée augmente la vitesse des érythrocytes, diminuant la quantité des neutrophiles adhérant à l'endothélium. Ceux pouvant y adhérer ont de plus une plus grande vitesse de roulement (Roman, LeGallo et al. 2004). En effet, dans les veinules et les artérioles à grand débit sanguin, les neutrophiles se déplacent majoritairement au centre des vaisseaux, alors que dans ceux au courant plus faible, ils se déplacent en périphérie, facilitant le roulement. Ainsi, la séquestration dans les capillaires est réduite lorsque le débit est élevé (Kuhnle, Kuebler et al. 1995). Ce phénomène est important car le mécanisme principal de la rétention des neutrophiles est l'entrave mécanique des cellules lors de leur passage dans les capillaires (Kuhnle, Kuebler et al. 1995).

#### *2.2.5 b I) Modulation de l'expression des molécules d'adhésion*

Il a été démontré que les donneurs de NO inhibaient l'expression des molécules d'adhésions (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) et de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8) induites par du LPS ou des cytokines chez des cellules endothéliales humaines de vaisseaux sanguins (De Caterina, Libby et al. 1995). Ces effets sont en partie le résultat de l'inhibition de l'activation du facteur de transcription du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Il est très important dans la réponse



inflammatoire et est impliqué dans l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et de cytokines pro-inflammatoires (Baeuerle and Henkel 1994). Le NO inhibe l'activation du NF- $\kappa$ B en induisant l'expression et la stabilisation de I $\kappa$ B- $\alpha$ , une protéine régulatrice qui inhibe la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau (Peng, Libby et al. 1995). Il a également été démontré que des inhibiteurs de NOS (tant iNOS que eNOS) augmentent le roulement et l'adhésion des neutrophiles (Dal Secco, Paron et al. 2004). De plus, les inhibiteurs des NOS augmentent l'expression des molécules d'adhésion CD11b/CD18, L, P, E-sélectines, ICAM-1 et VCAM-1 (Dal Secco, Paron et al. 2004).

### 2.2.6 Cytokines

Les polymorphonucléaires neutrophiles sont les premières cellules à migrer dans les tissus en présence d'un agent pathogène (Cassatella 1995). Bien que leurs fonctions premières dans la réponse inflammatoire ont longtemps été pensées comme étant la phagocytose ainsi que la relâche de formes réactives de l'oxygène et d'enzymes lytiques afin de détruire des bactéries, il a été démontré qu'ils avaient la capacité de produire des protéines (Lloyd and Oppenheim 1992). De plus, malgré le fait que chaque monocyte produit des quantités substantiellement plus grandes de cytokines qu'un neutrophile, il faut considérer qu'ils constituent la grande majorité des cellules qui s'infiltrant dans les tissus endommagés et peuvent donc représenter une source importante de production de cytokines dans ces tissus (Cassatella 1995).

Depuis la fin des années 1980, plusieurs études ont démontré la production d'un grand nombre de cytokines par les neutrophiles. Chez le cheval, l'expression de l'ARNm de diverses cytokines, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et MIP-2, a été démontré (Joubert, Silversides et al. 2001).

La production *in vitro* des chimiokines, (et de certaines autres cytokines) par les neutrophiles humains suite à une stimulation avec du LPS semble être modulée

par un réseau de cytokines qui implique l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$  (Cassatella 1995). Le fait que la relâche de cytokines induite par d'autres agonistes des neutrophiles tels que le TNF- $\alpha$ , le fMLP, l'Y-IgG soit également modulée par l'IL-10 et l'IFN- $\gamma$ , augmente les possibilités que les lymphocytes de type Th1 et Th2 puissent influencer la production des cytokines par les neutrophiles. En effet, l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire synthétisée par les monocytes, les lymphocytes B et Th, inhibe l'effet des monocytes/macrophages et contribue à la prolifération et à la différenciation des lymphocytes (Moore, O'Garra et al. 1993). En effet, elle inhibe la relâche extracellulaire du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1  $\alpha/\beta$ , l'IL-8, du GRO $\alpha$ , de l'IP-10, du MIP-1 $\alpha/\beta$  et de l'IL-12, induite par le LPS, mais augmente IL-1ra. De plus, l'IFN- $\gamma$ , produit par les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles (NK) engendre les effets opposés à ceux créés par l'IL-10 sauf pour l'IL-1ra (Cassatella, Gasperini et al. 1997). Pour ces raisons, les neutrophiles ne devraient pas être considérés seulement pour leur rôle dans la réponse inflammatoire mais aussi comme des cellules pouvant influencer la direction et l'évolution du processus immunitaire, via leur sécrétion de cytokines (Cassatella 1995).

### 2.3 NEUTROPHILES PULMONAIRES

Tel que mentionné précédemment, la microcirculation pulmonaire est un site majeur de la séquestration des neutrophiles. L'inflammation pulmonaire engendre l'activation et le recrutement de ces neutrophiles. Ceux-ci produisent des enzymes cytotoxiques et des formes réactives de l'oxygène pouvant causer des dommages aux poumons et des modifications dans le débit du sang et dans les échanges gazeux au niveau de la microcirculation pulmonaire (Fukatsu, Saito et al. 1997). Il a été démontré que l'inhibition du NO endogène a un effet direct sur l'augmentation de la séquestration des neutrophiles dans la circulation pulmonaire (Roman, LeGallo et al. 2004), ce qui suggère que ce NO pourrait jouer un rôle critique dans le contrôle des interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales dans le poumon.

### **3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

#### **3.1 HYPOTHÈSES**

1. Le NO est sécrété par les neutrophiles sanguins équins
2. La sécrétion du NO par les neutrophiles sanguins augmente avec le temps d'incubation suite à une stimulation avec de l'IFN- $\gamma$  et du LPS
3. La iNOS est sécrétée par les neutrophiles sanguins
4. L'expression de la iNOS des neutrophiles sanguins est directement proportionnelle à la sécrétion de NO

#### **3.2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

1. Identifier la présence d'oxyde nitrique sécrété par les neutrophiles sanguins équins *in vitro*
2. Établir une cinétique de la sécrétion d'oxyde nitrique par les neutrophiles sanguins équins
3. Identifier l'expression de l'ARNm de la iNOS des neutrophiles sanguins par une technique de PCR
4. Établir la cinétique de l'expression de l'ARNm de la iNOS par les neutrophiles sanguins

# ***MÉTHODOLOGIE***

## **4. ANIMAUX**

Pour cette étude, quatre juments de race Standardbred âgées de 5,75 ans  $\pm$  2,87 furent utilisées. Tous ces chevaux, maintenus en stabulation sur une litière de paille et nourris avec du foin et de la moulée ont été soumis à un programme de vaccination et de vermifugation complet quelques semaines avant les expérimentations. Ces juments ne présentaient aucun signe ou symptôme de quelque maladie. Un examen hématologique réalisé sur chacune des juments s'est révélé normal.

L'utilisation des animaux pour cette étude était conforme aux politiques et aux normes de l'Université de Montréal et en accord avec les principes et recommandations du conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Le projet fut approuvé par le Comité de déontologie animale de la Faculté de Médecine vétérinaire.

## **5. PROTOCOLES**

### **5.1 ISOLEMENT DES NEUTROPHILES**

#### *5.1.1 Type de gradient de densité utilisé*

Les milieux iodés, utilisés lors de nos manipulations, sont des dérivés de l'acide métrizoïque. Ils ont été développés comme milieu de contraste radiographique, mais leurs propriétés permettant la préparation de solutions denses à des concentrations relativement faibles ont rapidement été reconnues pour créer des milieux de gradients de densité. Les milieux non ioniques dérivés de l'acide

métrizoïque sont denses, inertes, non toxiques, possèdent de faibles osmolalité et viscosité et peuvent former des gradients stables (Ford and Graham 1991).

Nous avons utilisé pour l'isolement des neutrophiles la technique du Lympholyte®-Poly (CL5070 Cedarlane<sup>1</sup>). Le Lympholyte®-Poly est une solution de métrizoate de sodium et de Dextran 500 qui est utilisée pour l'isolement des granulocytes du sang entier humain. Sa densité est de  $1.113 \pm 0.001$  g/ml et son osmolalité de  $460 \pm 15$  mOsm. L'osmolalité élevée du Lympholyte®-Poly engendre la perte d'eau et donc le rétrécissement des érythrocytes, ce qui augmente leur densité. Ceci permet au Dextran d'agréger les érythrocytes et permet une sédimentation rapide de ceux-ci à travers le milieu dense ( $\rho = 1,113$  g/ml). Le gradient osmotique entre le milieu et les érythrocytes diminue au fur et à mesure que ces cellules sédimentent (la perte d'eau des érythrocytes est plus grande sur le dessus de Lympholyte®-Poly et diminue progressivement). Les neutrophiles forment une bande à l'intérieur du gradient de densité alors que les cellules mononucléées restent à l'interface échantillon/gradient de densité (protocole du Lympholyte®-Poly (Cedarlane<sup>1</sup>)).

### 5.1.2 Prélèvement des échantillons sanguins

Le sang qui est utilisé pour réaliser l'isolement des neutrophiles est prélevé dans des tubes EDTA de 7 ml par une ponction de la veine jugulaire gauche à l'aide d'une aiguille 20 G 1/2 de type Vacutainer.

### 5.1.3 Isolement des neutrophiles

Cinq ml de sang entier frais doivent être déposés délicatement sur 5 ml de Lympholyte-poly® dans un tube de centrifugation stérile de 15 ml (Fisher<sup>3</sup>). Les tubes doivent par la suite être centrifugés pendant 35 min à 1 580 rpm à 20°C dans

une centrifugeuse à support mobile (Beckman<sup>4</sup>). Après la centrifugation, il est possible d'observer différentes couches dans les tubes. La bande de neutrophiles qui doit être récoltée se situe entre les monocytes (bande blanche très dense sous le plasma) et la couche de Lympholyte-poly®. La fraction ainsi isolée doit être déposée dans un tube de centrifugation stérile de 50ml (Fisher<sup>3</sup>). Par la suite, une lyse érythrocytaire doit être effectuée afin d'enrayer la contamination par les érythrocytes, de la suspension de neutrophiles. Cette lyse est réalisée en ajoutant 10 ml de solution hypotonique (0,1125%), permettant le bris des érythrocytes, puis en mélangeant vigoureusement pendant 30s. Dix ml de solution hypertonique (1,6875%) doivent rapidement être ajoutés afin de rétablir l'isotonicité du milieu.

Ces deux solutions utilisées lors de la lyse érythrocytaire sont préparées chaque jour dans des conditions stériles. La solution hypotonique (0,1125%) est un mélange de 150 ml d'eau distillée ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) et de 50 ml de solution saline 0,45%. La solution hypertonique (1,6875%) est quant à elle un mélange de 76,8 ml d'eau distillée ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) et de 23,2 ml de solution saline 7,2%.

Les tubes doivent ensuite être centrifugés pendant 10 min à 1 490 rpm à 20°C afin d'enlever les débris cellulaires. Le culot est alors resuspendu dans une solution de saline isotonique puis une seconde lyse érythrocytaire est effectuée. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans du milieu de culture.

Le milieu de culture est fraîchement préparé dans des conditions stériles chaque jour et conservé à 4°C à l'abri de la lumière. Afin de préparer 20,6 ml de milieu de culture, 18 ml de *Dubelcco's modified eagle medium* (D-MEM) à haute teneur en glucose et sans rouge de phénol (Invitrogen<sup>2</sup>), 2 ml de sérum fœtal bovin (FBS), 200 µl d'antibiotique pénicilline-streptomycine (Pen-Strep) contenant 5 000 unités de pénicilline et 5 000 µg de streptomycine /ml (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) et

400  $\mu$ l de L-glutamine (200 mM) (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) sont mélangés ensemble.

#### 5.1.4 Isolement des leucocytes

Le sang utilisé lors de l'isolement des leucocytes est récolté de la même façon que celui pour l'isolement des neutrophiles. Les tubes EDTA de 7 ml sont centrifugés pendant 7 min à 3 500 rpm à 20°C. Une fine bande de cellules blanches se situe à l'interface des érythrocytes. Il faut prélever cette bande, sans tenir compte des érythrocytes, et la déposer dans un tube de centrifugation stérile de 50 ml (Fisher<sup>3</sup>). Les érythrocytes sont ensuite lysés de la même façon que lors de l'isolement des neutrophiles et entre chaque lyse (3 au total) les cellules sont centrifugées à 1 490 rpm à 20°C pendant 10 min. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans du milieu de culture.

#### 5.1.5 Comptage cellulaire

Afin de déterminer la quantité de cellules isolées, et ainsi de préparer des échantillons avec une quantité fixe de cellules, 20  $\mu$ l de la suspension cellulaire résultant de l'isolement sont mélangés avec 80  $\mu$ l de milieu de culture dans un tube Eppendorf en polypropylène de 1,5 ml stérile (Ultident<sup>5</sup>). Vingt  $\mu$ l de bleu de Trypan (Invitrogen<sup>2</sup>) sont ensuite ajoutés à la suspension cellulaire diluée, puis après quelques minutes d'attente (permettant la coloration en bleu des cellules mortes), 20  $\mu$ l du mélange sont placés sur un hémacymètre (Reichert<sup>6</sup>), afin de procéder au décompte des cellules vivantes ainsi que des mortes.



### 5.1.6 Pureté cellulaire

La constitution des différentes suspensions cellulaires (soit neutrophiles ou cellules blanches totales) est déterminée lors de la préparation de lames colorées au Diff Quick. Quatre cents cellules sont alors comptées permettant ainsi de déterminer la pureté des échantillons de la suspension cellulaire de neutrophiles et de déterminer les différentes concentrations cellulaires dans la suspension de leucocytes (cellules blanches totales).

## 5.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

### 5.2.1 Stimulation et incubation des neutrophiles et des leucocytes sanguins totaux

Lors des expérimentations, 10 millions de neutrophiles ou de leucocytes sanguins totaux sont mis en suspension dans 250 µl de milieu de culture (D-MEM / FBS / L-glutamine / Pen-Strep) et incubés dans des tubes Eppendorf en polypropylène de 1,5 ml (Ultident<sup>5</sup>). Les cellules sont stimulées avec 1 µg de LPS (Sigma<sup>7</sup>) et 25 ng d'IFN-γ recombinant équin provenant d'*E. coli* (1586-HG, R&D systems<sup>8</sup>) (sauf dans les tubes contrôles (T<sub>0</sub>)). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 6 ou 12 h.

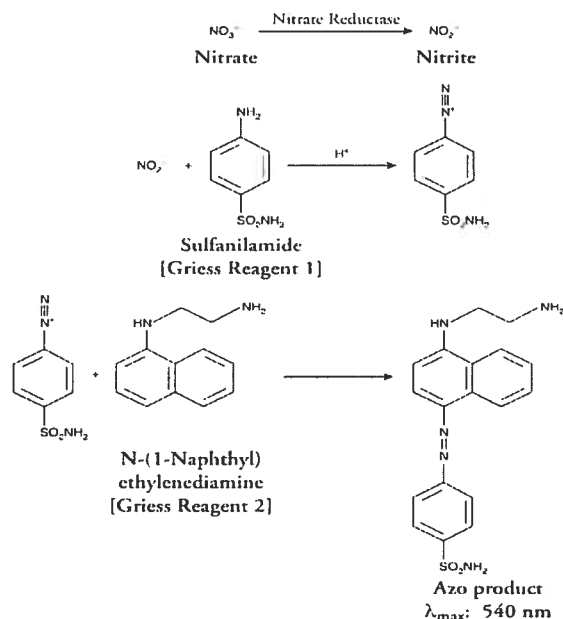
### 5.2.2 Conservation des échantillons

À la fin de la période d'incubation, les tubes Eppendorf doivent être centrifugés à 8 000 rpm à 4°C pendant 5 min, afin de séparer les cellules et le surnageant. Le surnageant est conservé à -80°C dans un nouveau tube Eppendorf en

polypropylène de 1,5 ml (Ultident<sup>5</sup>) afin de permettre une quantification ultérieure des nitrites et nitrates. Le culot cellulaire est quant à lui homogénéisé dans 1 ml de Trizol (Invitrogen<sup>2</sup>) à l'aide d'une seringue tuberculine et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  afin d'en extraire l'ARNm ultérieurement.

### **5.3 QUANTIFICATION DES NITRITE ET NITRATE PAR LE *NITRATE/NITRITE COLORIMETRIC ASSAY KIT (LDH METHOD)***

Le NADPH est un cofacteur essentiel pour le bon fonctionnement des isoformes de NOS. De plus, les enzymes réductrices de nitrate utilisent également le NADPH lors de la réduction du nitrate en nitrite. Cependant, le NADPH interfère dans la chimie de la réaction de Griess, qui est la méthode de quantification des nitrites la plus utilisée. Il existe deux façons de prévenir cette interférence. La première est l'utilisation de faible quantité de NADPH de concert avec l'emploi d'un système catalytique servant à recycler le  $\text{NADPH}^+$  en NADPH. La seconde méthode est l'utilisation de NADPH ajouter en excès dans la préparation. En effet, le *Lactate dehydrogenase* (LDH) est utilisé pour oxyder le surplus de NADPH. La figure 4 démontre les effets du réactif 1 et 2 lors du processus de colorimétrie. Ces informations proviennent du protocole fournit avec le kit de colorimétrie de *Cayman chemical* du produit *Nitrate/nitrite Colorimetric Assay kit (LDH Method)* (760871)).



**Figure 4 : Mode d'action des réactifs *Griess Reagent 1* et *2* (tirée du protocole de *Cayman chemical* du produit *Nitrate/nitrite Colorimetric Assay kit (LDH Method)* (760871))**

La première étape à effectuer lors de cette manipulation est la reconstitution de tous les réactifs lyophilisés qui sont fournis ainsi que du NADPH (Sigma<sup>7</sup>), avec du tampon, faisant lui-même parti de l'ensemble de colorimétrie (Cayman chemical<sup>9</sup>). Par la suite, il faut préparer la courbe standard de nitrate en mélangeant 0,1 ml du nitrate préalablement reconstitué dans 1 ml de milieu de culture, avec 0,9 ml de milieu de culture. La concentration de ce standard est alors 200  $\mu\text{M}$ . Cette solution est ensuite utilisée pour former la courbe standard dans les puits de la plaque fournie pour l'analyse. La courbe standard utilisée avec les échantillons de plasma devra être faite de la même façon mais en diluant le nitrate dans la solution tampon au lieu du milieu de culture. Dans le premier puit, il ne faut pas mettre de nitrate; dans le second, il faut placer 5  $\mu\text{l}$  et augmenter ainsi de 5  $\mu\text{l}$  jusqu'à 25  $\mu\text{l}$  de nitrate puis il faut compléter à 60  $\mu\text{l}$  avec du tampon. La courbe standard est effectuée en duplicata. Cent quarante  $\mu\text{l}$  de tampon et 60  $\mu\text{l}$  de milieu de culture doivent être déposés dans deux puits afin de faire la lecture de blanc lors de la

quantification du milieu de culture alors que 200  $\mu\text{l}$  de tampon doivent être utilisés lors de la lecture de blanc pour les échantillons de plasma.

Les échantillons de milieu de culture qui sont utilisés lors de cette analyse ne doivent pas subir aucun traitement particulier. Toutefois, les échantillons de plasma devront être ultrafiltrés (20 min à 4000 rpm) à l'aide de filtres de 30 kDa (Millipore<sup>10</sup>) préalablement rincés avec de l'eau Ultra Pure (Invitrogen<sup>2</sup>) afin de réduire les bruits de fond d'absorbance causés par l'hémoglobine.

Lorsque tous les réactifs sont prêts, il faut mettre les échantillons de la courbe standard ainsi que les échantillons (en triplicata pour les échantillons de milieu de culture et en duplicata pour le plasma) dans les puits de la plaque. Par la suite, 10  $\mu\text{l}$  de NADPH (1mM) et 10  $\mu\text{l}$  de nitrate réductase sont ajoutés, puis la plaque est incubée à la température de la pièce pendant 40 min (ou 60 min pour le plasma). Dix  $\mu\text{l}$  de solution de cofacteurs et 10  $\mu\text{l}$  de solution de lactate déshydrogénase sont ajoutés, suivi d'une incubation de 20 min à la température de la pièce. Finalement, il faut ajouter 50  $\mu\text{l}$  de réactif Griess R1 et immédiatement 50  $\mu\text{l}$  de réactif Griess R2 puis faire développer la couleur pendant 10 min avant de lire l'absorbance de la plaque à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde de 540 nm.

Les absorbances ainsi détectées seront transformées en concentration ( $\mu\text{M}$ ) de nitrate + nitrite selon l'équation suivante :

$$[\text{Nitrate} + \text{Nitrite}] (\mu\text{M}) = \left( \frac{\text{A}_{540} - \text{ordonnée à l'origine}}{\text{pente}} \right) \left( \frac{200\mu\text{l}}{\text{Volume d'échantillon utilisé } (\mu\text{l})} \right) \times \text{dilution}$$

Les données relatives à la pente et à l'ordonnée à l'origine ont été calculées par le programme informatique relié au lecteur de plaque en fonction des données de la courbe standard.

## 5.4 QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA INOS ÉQUINE PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL (LIGHT CYCLER)

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique qui a été développée dans les années 1980 par Kary Mullis (Saiki, Scharf et al. 1985). Depuis, ses applications se sont multipliées et elle est maintenant utilisée pour le clonage, la détection de mutation, l'expression des gènes et le diagnostic de diverses maladies.

La réaction en chaîne en présence de polymérase a pour fonction d'amplifier enzymatiquement un segment donné d'ADN compris entre deux courtes régions dont les séquences sont connues (amorces) afin d'obtenir un très grand nombre de copies de cette portion d'ADN (Lodish, Baltimore et al. 1997).

Afin de procéder à cette réaction, l'ADN doit d'abord être scindé en longs fragments par des enzymes de restrictions. La première étape de la PCR est la dénaturation des brins bicaténaires d'ADN en brins monocaténares qui s'effectue par chauffage. La seconde étape, consiste en l'hybridation des oligonucléotides synthétiques complémentaires des extrémités 3' des brins du segment d'ADN d'intérêt (amorces) aux simples brins d'ADN, effectuée à de plus faibles températures (entre 50 et 60°C) (Lodish, Baltimore et al. 1997). Les brins complémentaires de l'ADN ont peu de chance de se rencontrer puis de s'hybrider car ils sont présents en très faible concentration dans la préparation alors que les amorces y sont présentes en très forte concentration. Elles s'hybrident donc aux séquences d'ADN qui leurs sont complémentaires et servent d'amorces à la synthèse de nouveaux brins d'ADN, phénomène nommé élongation, consistant en la troisième et dernière étape d'un cycle de PCR. L'élongation est engendrée par l'ajout des désoxynucléotides triphosphates (dNTP) et d'une ADN polymérase thermorésistante, telle celle de *Thermus aquaticus* (eubactérie des sources chaudes). Cette enzyme, nommée polymérase *Taq*, allonge les segments adjacents aux amorces vers l'extrémité 5' du brin d'ADN, à des températures pouvant atteindre 72°C. Lorsque la synthèse des nouveaux brins est

terminée, la température est augmentée à 95°C afin de dénaturer les duplex d'ADN néoformés afin de recommencer un second cycle d'amplification. Chacun des brins sera par la suite utilisé pour la synthèse de nouveaux brins lors des amplifications subséquentes, ce qui signifie que chaque cycle double le nombre d'exemplaire de la séquence désirée et que le nombre de molécules croît de façon exponentielle (Lodish, Baltimore et al. 1997).

#### 5.4.1 Réactifs :

Divers réactifs sont utilisés lors de la réaction de PCR. Des modifications de ces différents constituants pourront moduler la spécificité et/ou la quantité du produit amplifié. Le chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ), utilisé en excès, pourrait engendrer l'accumulation de produits d'amplification non-spécifique, alors qu'en quantité insuffisante, il diminue le rendement. Les désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont les nucléotides qui seront utilisés pour former les nouveaux amplicons lors de l'élongation. Ils se lient au  $MgCl_2$  et déterminent donc la quantité d'ions  $Mg^{2+}$  libre dans la solution. Les amorces doivent être sélectionnées avec soin. La spécificité et le rendement de la réaction de PCR sont directement reliés à la qualité des amorces. Leur longueur varie généralement entre 20 et 30 nucléotides et leur composition en nucléotide G et C doit être similaire à celle du fragment qui sera amplifié (Saiki 1989).

Finalement, il est primordial d'ajouter une enzyme servant à polymériser les brins d'ADN. À l'origine, le fragment Klenow d'ADN polymérase I de *E. coli* était utilisé pour l'élongation de la PCR. Cependant, cette enzyme était inactivée par la chaleur et une nouvelle enzyme devait être ajoutée à chaque cycle (Saiki 1989). Depuis, l'enzyme polymérase *Taq*, qui est thermostable est couramment utilisée dans les réactions de PCR. À des températures atteignant 75-80°C, elle peut synthétiser jusqu'à 150 nucléotides par seconde par molécule d'enzyme (Gelfand 1989). Présente en trop grande quantité dans les échantillons, elle peut augmenter la

production de produits non spécifiques et diminuer le niveau de production de la séquence désirée (Saiki 1989).

Deux innovations ont grandement contribué à la simplification de la technique de PCR : l'automatisation des cycles de température et l'utilisation de l'ADN polymérase *Taq* (Oste 1989). La venue de la *Taq* a permis l'utilisation de trois différentes températures plutôt que de deux, comme lors de l'utilisation du fragment Klenow d'*E. coli*. En effet, il est maintenant possible de régler différentes températures lors de l'hybridation et de l'élongation et elles peuvent donc être optimisées indépendamment. L'élévation de la température de l'élongation lors de la réaction de PCR augmente la spécificité de la technique (Oste 1989). La création de thermocycleurs a diminué le temps de la manipulation. Divers mécanismes ont été conçus pour le refroidissement et le réchauffement des échantillons tels que l'utilisation de liquides, de résistances et de semi-conducteurs (Oste 1989).

#### 5.4.2 PCR en temps réel

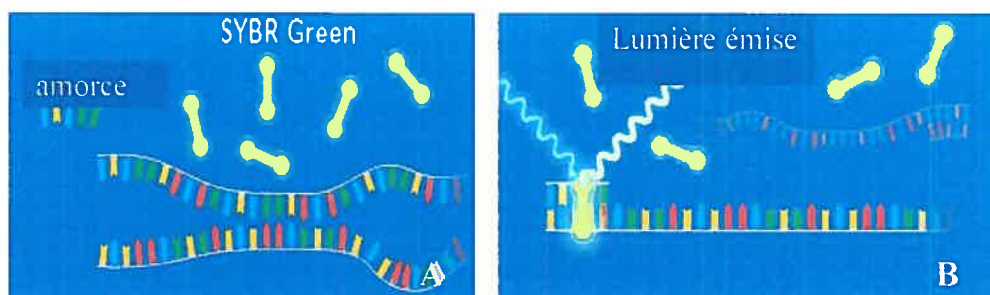
L'invention du PCR en temps réel a révolutionné la quantification de l'expression des gènes. Tel que mentionné plus haut, le PCR crée des copies d'ADN de façon exponentielle. Toutefois, à partir du moment où les réactifs ont été épuisés, la réaction de PCR atteint la phase de plateau ce qui rend la quantification incertaine (Dötsch, Schoof et al. 2004). Cependant, la quantification de la phase exponentielle de la réaction de PCR est plus intéressante.

##### 5.4.2. a) *Light Cyclers*

Le LightCycler est un thermocycleur rapide (à air pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre. Il est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement. Les capillaires sont des

tubes de verre (pas de résistance thermique) fermés, de 1,5 mm de diamètre et de 3 cm de hauteur, ce qui leur confère une grande superficie d'échange, la lumière émise par le fluorophore (SYBR Green I) est concentrée au bas du capillaire (manuel d'instruction du Light Cycler (Roche<sup>11</sup>)). La température est la même dans le capillaire. À chaque cycle, chaque capillaire passe devant le système optique et la fluorescence est lue. Une expérience dure de 30 min à 1h.

Le SYBR Green I est un fluorophore spécifique à l'ADN double brin et sa fluorescence est augmentée lors de sa liaison avec l'ADN. Lors de chaque phase de la synthèse de l'ADN, le SYBR Green I se lie aux produits de PCR amplifiés et l'amplicon peut être détecté par sa fluorescence dont le signal est proportionnel à la concentration de l'ADN nouvellement synthétisé. Le SYBR Green I se lie au sillon mineur de l'ADN bicaténaire. En solution, lorsqu'il est non lié, il démontre très peu de fluorescence.

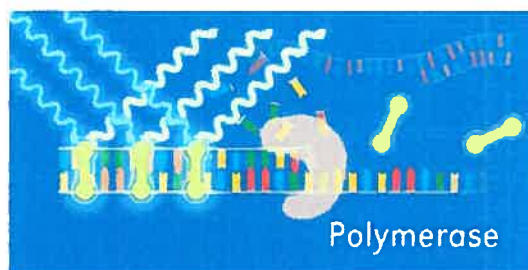


**Figure 5 : Représentation de la fluorescence émise par le SYBR Green I avant le début de la réaction (A) et lors de l'hybridation entre les amorces et les brins d'ADN (B) (tirée du protocole du Light Cycler DNA Master SYBR Green I (201 5099) de chez Roche<sup>11</sup>)**

Au début de l'amplification, le mélange de la réaction de PCR contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le SYBR Green I. La faible fluorescence émise par celui-ci est soustraite lors de l'analyse par l'ordinateur (figure 5A). Après l'hybridation des amorces, quelques molécules de SYBR Green I peuvent se lier à

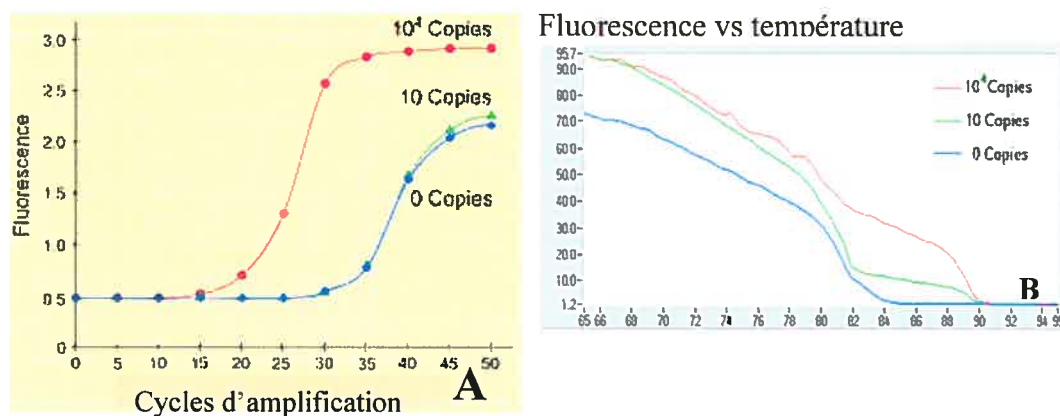


l'ADN double brin (figure 5B). Cette liaison permet l'expression de lumière par le SYBR Green I.



**Figure 6: Représentation de la fluorescence émise par le SYBR Green I lors de l'élongation (tirée du protocole du Light Cycler DNA Master SYBR Green I (201 5099) de chez Roche<sup>11</sup>)**

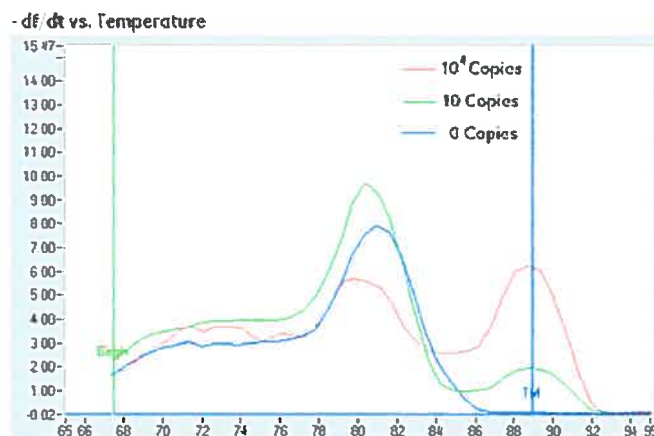
Lors de l'élongation, de plus en plus de molécules de SYBR Green I se lient à l'ADN nouvellement synthétisé (figure 6). Si la réaction est continuellement enregistrée, il est possible d'observer l'augmentation de la fluorescence en temps réel. Lors de la dénaturation de l'ADN pour le cycle suivant, les molécules de SYBR Green I sont relâchées et le signal de fluorescence tombe.



**Figure 7: Représentation d'un graphique de fluorescence en fonction du nombre de cycle (A) et d'un graphique d'une courbe de fusion (B) (tirée du protocole du Light Cycler DNA Master SYBR Green I (201 5099) de chez Roche<sup>11</sup>)**

De plus, le Light Cycler peut fournir l'analyse de la courbe de fusion (*melting curve*) du produit de la réaction de PCR. Le point de fusion d'un fragment d'ADN dépend de sa longueur et de sa composition en nucléotide G/C. La détermination de la température de fusion d'un fragment d'ADN peut donc être utilisée pour caractériser le produit amplifié. La figure 7A représente un graphique de la fluorescence en fonction du nombre de cycles pour trois échantillons avec un nombre de copies d'ADN différent au départ. Il est possible de remarquer que lorsque le nombre de copies est grand, l'amplification spécifique de l'ADN est observée lors des premiers cycles (courbe rouge). Toutefois, lorsque le nombre de copies est plus faible (courbe verte), des produits d'amplification non spécifique, généralement des dimères d'amorces (courbe bleu), peuvent masquer le signal spécifique.

La figure 7B, représente les courbes de fusion des trois échantillons. L'axe des Y démontre la fluorescence alors que l'axe des X montre la température. Les différentes pentes représentées ici indiquent que les échantillons contiennent différentes quantités de produits non spécifiques qui ont une température de fusion plus faible.



**Figure 8: Représentation d'une courbe de la dérivée négative en fonction de la température (tirée du protocole du Light Cycler DNA Master SYBR Green I (201 5099) de chez Roche<sup>11</sup>)**

Lorsqu'une courbe de la dérivée négative en fonction de la température est tracée, la différence entre les trois échantillons est plus évidente (figure 8). Les pics du côté gauche sont dus à des dimères d'amorces, qui ont un point de fusion plus bas, alors que les pics du côté droit représentent les produits d'amplification spécifique. Ces pics sont plus petits lorsque la quantité de copies d'ADN initiale est plus faible (courbe verte). Il est de plus possible de remarquer qu'il n'y a aucun signal spécifique dans l'échantillon qui ne détenait aucune copie initialement (courbe bleu).

### 5.4.3 Extraction de l'ARNm

Les échantillons dans le Trizol doivent tout d'abord être décongelés sur la glace puis être incubés à la température de la pièce pendant 5 min. Deux cents  $\mu$ l de chloroforme (Sigma<sup>7</sup>) doivent ensuite être ajoutés. Les tubes doivent ensuite être mélangés vigoureusement pendant 5 s à toutes les 30 s pendant une période d'incubation de 5 min à la température de la pièce. Il faut ensuite centrifuger les échantillons à 11 000 rpm pendant 15 min à 4°C. Afin de permettre la précipitation de l'ARN, il faut prélever la phase aqueuse (transparente) des tubes Eppendorf en évitant de toucher à la phase laiteuse (protéines). Il faut ensuite mélanger délicatement cette phase aqueuse à 500  $\mu$ l d'isopropanol froid (Sigma<sup>7</sup>) dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml, puis laisser incubé 10 min à la température de la pièce. Les échantillons sont alors centrifugés à 11 000 rpm pendant 10 à 15 min à 4°C. Le surnageant est par la suite enlevé et 1 ml d'éthanol 75% (Sigma<sup>7</sup>) est ajouté dans les tubes afin de laver l'ARN. Il faut mélanger délicatement le contenu des tubes. Ils sont finalement recentrifugés à 7 500 rpm pendant 5 min à 4°C afin de faire culotter l'ARN. Le surnageant est retiré et le culot d'ARN doit sécher jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un fin halot d'éthanol autour. Le culot doit alors être resuspendu dans 15  $\mu$ l d'eau ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) et la quantification de l'ARN extrait est évaluée par une mesure de l'absorbance à 260 nm et sa qualité est déterminée par le ratio des absorbances à 260/280 nm.

#### 5.4.4 Formation d'ADNc (RT)

La quantification de l'ARNm afin d'évaluer l'expression des gènes a longtemps été réalisée par la technique d'immunobuvardage de type Northern. Toutefois, cette méthode requiert une grande quantité d'ARN et est plutôt longue à effectuer.

La transcription inverse (RT) permet la production d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN à l'aide d'une enzyme rétrovirale de type transcriptase inverse. Deux types d'enzymes sont disponibles commercialement, soit le virus Moloney de la leucémie murine (MMLV-RT) et le virus de la myéloblastose aviaire (AMV-RT) (Freeman, Walker et al. 1999). L'utilisation de cette méthode, couplée à la technique de PCR mènera à l'utilisation de la RT-PCR pour la quantification de l'ARNm.

La synthèse de l'ADNc est engendrée par une amorce d'oligonucléotides qui s'hybride à l'ARN. L'ADNc est alors formée vers l'extrémité 5' de l'ARNm grâce à l'activité polymérase de l'enzyme de transcription inverse (Freeman, Walker et al. 1999). Les amorces peuvent être spécifiques au gène, ou non. Les amorces non spécifiques sont constituées de résidus de désoxythymidine (oligo(dT)) qui s'hybrident à la queue polyadénylée (poly A) que l'on retrouve chez la majorité des ARNm (Freeman, Walker et al. 1999). Les amorces spécifiques sont quant à elles généralement utilisées dans des réactions de RT lorsque l'ARNm est présente en faible quantité dans les échantillons. Elles augmentent la spécificité et diminuent les bruits de fond associés avec les amorces non spécifiques (Freeman, Walker et al. 1999). L'ADNc ainsi produit peut être utilisé dans une réaction de PCR afin de l'amplifier.

Afin de procéder à la rétro-transcription de l'ARNm, il faut faire chauffer 2 µg d'ARN (en suspension dans de l'eau ultra pure) dans un volume total de 9 µl d'eau ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) pendant 5 min à 70°C dans un tube Eppendorf de 1,0 ml. Par la suite, 1 µl d'oligo dT (Invitrogen<sup>2</sup>) doit être ajouté et le mélange doit chauffer à 70°C 10 min puis il faut mettre sur la glace. Vingt µl d'un mélange contenant 10,5 µl d'H<sub>2</sub>O ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>), 7,2 µl de tampon RT 5X (Roche<sup>11</sup>), 2,4 µl de DTT (Invitrogen<sup>2</sup>), 1,5 µl de dNTP (Invitrogen<sup>2</sup>), 1,2 µl de RNA guard (Amersham<sup>12</sup>) et 1,2 µl de AMV (Roche<sup>11</sup>) doivent finalement être ajoutés. Le RNA guard et le AMV doivent être ajoutés au mélange à la dernière minute car ils sont thermosensibles. Les tubes sont ensuite incubés pendant 1 h à 50°C, puis chauffés 1 min à 100°C afin d'inactiver les enzymes et finalement congelés à -20°C

#### 5.4.5 Quantification de l'expression du gène (PCR)

##### **5.4.5 a) Amorces utilisées pour la méthode de PCR de la iNOS équine**

Les amorces sens (5'-GCCAAGGTCTGAGCTACCTG-3') et antisens (5'-ATAGGTGAGTGCCTGGCTGA-3'), localisées entre 2 285pb et 2 490pb du gène de la iNOS équine caractérisé par Hammond (AY027883) (Hammond, Flower et al. 2002) et totalisant 205 pb, ont été utilisées. Ces amorces ont été créées par le Dr. Lavoie du Département de sciences cliniques de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et synthétisées dans les laboratoires d'Invitrogen<sup>2</sup>.

##### **5.4.5 b) Préparation du mélange pour la réaction de PCR**

Les réactifs nécessaires à la réaction de PCR ont été mélangés dans un tube Eppendorf de 1,0 ml. Tous les produits sont, sauf les amorces, fournis dans l'ensemble de chez Roche<sup>11</sup> nommé Light Cycler DNA Master SYBR Green I (201

5099). Cet ensemble contient donc de l'H<sub>2</sub>O ultra pure, du MgCl<sub>2</sub> et du SYBR Green I. 13,4 µl d'H<sub>2</sub>O ultra pure, 1,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (concentration initiale de 25 mM et finale de 3mM), 2,0 µl de SYBR Green I et 1,0 µl de chacune des amorces (concentration initiales de 50 µM) sont mélangés ensemble. Un µl d'ADNc est ensuite ajouté dans le tube Eppendorf et ce mélange est transféré dans un capillaire (Roche<sup>11</sup>). Un capillaire ne contenant pas d'ADNc servira de contrôle négatif lors de la réaction de PCR. Les capillaires sont centrifugés 5 s à 8 000 rpm afin de faire descendre la préparation.

#### **5.4.5 c) Conditions d'amplification**

Tous les capillaires sont placés dans le carrousel du Light Cycler et soumis au même programme d'amplification soit : un programme de dénaturation d'un cycle de 30 s à 95°C suivi du programme d'amplification constitué d'une période de dénaturation à 95°C pour 0 s, d'une période d'hybridation de 6 s à 64°C suivie d'une élongation de 12 s à 72°C pendant 45 cycles.

#### **5.4.5 d) Observation des résultats de PCR par électrophorèse**

Le contenu des capillaires est déversé dans des tubes Eppendorf de 1,0 ml lors d'une centrifugation de 5 s à 8 000 rpm. Quatre µl de solution de bleu de bromophénol (Invitrogen<sup>2</sup>) sont ensuite ajoutés aux 20 µl de produit d'amplification et mélangés. Le contenu de chaque tube est par la suite transféré dans les puits d'un gel d'agarose (1,5%) formé à partir de 0,6 g de poudre d'agarose (Invitrogen<sup>2</sup>), de 40 ml de tampon tris-acétate-EDTA (TAE) et de 1µl de bromure d'éthidium. Le premier puit contient les fragments d'ADN standard (Invitrogen<sup>2</sup>), une échelle de type *Ready-load* de 1Kb. Lorsque les puits sont remplis, les fragments d'ADN migrent pendant 60 min à 70 volts. Le gel d'agarose est ensuite photographié sous les ultra-violets.

## 5.5 DÉTERMINATION DE LA SÉQUENCE D'ADN AMPLIFIÉE PAR PCR

### 5.5.1 Extraction de l'ADN du gel d'électrophorèse

L'extraction de l'ADN du gel d'électrophorèse est effectuée à l'aide d'un ensemble de chez Qiagen<sup>13</sup> utilisant des colonnes. La première étape consiste à couper, sous la lumière ultra violet, la portion du gel colorée au bromure d'éthidium qui contient le fragment d'ADN souhaité, déterminé en fonction du poids moléculaire. Tel que mentionné plus haut, le fragment d'ADN de iNOS équine contient 205 pb. Cette portion de gel est ensuite pesée afin de déterminer le volume des différents réactifs à ajouter lors de l'extraction. Il faut tout d'abord ajouter trois volumes de tampon QG pour un volume de gel dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et faire chauffer à 50°C pendant 10 min en vortexant le tout à toutes les 2-3 min. Lorsque le gel est complètement dissout il faut ajouter un volume d'isopropanol et mélanger. La préparation doit ensuite être transférée dans les colonnes fournies et le contenu est filtré et aspiré par le système d'aspiration utilisant une pompe à vide. Un lavage utilisant 500 µl de tampon QG permet d'enlever les traces d'agarose restantes. 750 µl de tampon PE sont ensuite ajoutés et le tout est ensuite aspiré après un temps d'attente de 2 à 5 min. Les colonnes sont ensuite centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 min dans un tube afin de retirer le tampon PE restant. Quinze µl d'eau distillée ultra pure (GIBCO BRL, Invitrogen<sup>2</sup>) sont finalement ajoutés sur le filtre de la colonne et celle-ci est ensuite centrifugée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml à 13 000 rpm pendant 1 min afin d'éluer l'ADN. La solution contenant l'ADN est conservée dans un congélateur à -20°C. La quantification de l'ADN extrait est évaluée par une mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm.

### 5.5.2 Clonage de la séquence d'ADN extraite dans un vecteur plasmidien

Le pGEM®-T Easy vector system (Promega<sup>14</sup>) est un système très utilisé pour le clonage de produit de PCR. Le vecteur est préparé en coupant le pGEM®-T Easy vector avec *EcoR* V et en ajoutant une thymine 3' terminale aux deux extrémités. Ces thymines améliorent grandement l'efficacité de liaison du produit de PCR dans le plasmide en prévenant la reformation circulaire du vecteur. Ce vecteur contient divers sites de restriction permettant la relâche de l'insert par la digestion d'une seule enzyme de restriction.

#### **5.5.2 a) Ligation des produits de PCR avec le vecteur pGEM®-T**

Trois µl d'ADN dilué dans de l'eau ultra pure sont mélangés avec 5 µl de tampon de ligation 2X, 1 µl (50 ng) de vecteur pGEM®-T Easy et 1 µl de ligase d'ADN T4 (3 Weiss units/µl). Cette préparation doit être adéquatement mélangée par pipettage et incubée toute la nuit à 4°C afin de permettre un meilleur taux de transformation.

#### **5.5.2 b) Transformation des bactéries DH5 α**

Il faut tout d'abord préparer deux pétris TB/ampicilline/IPTG/X-Gal pour chaque réaction de ligation. Le milieu TB est constitué de deux solutions; la première est composée de 900 ml d'eau distillée, de 12 g de tryptone, de 24 g de levure, de 4 ml de glycérol et de 12 g d'agar qui sont mélangés ensemble, autoclavés puis refroidis, alors que la seconde est composée de 100 ml d'eau distillée, de 2,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et de 12,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> qui sont mélangés, autoclavés puis refroidis. Ces deux solutions sont mélangées ensemble et y sont ajoutés 50 µg/ml d'ampicilline, 100 µl d'une solution de 100mM de IPTG et 100 µl d'une solution de 20 mg/ml de X-Gal.



Deux  $\mu\text{l}$  de réaction de ligation doivent être mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Cinquante  $\mu\text{l}$  de bactéries partiellement décongelées doivent être transférés dans ce tube et ce mélange doit être incubé sur la glace pendant 30 min après l'avoir délicatement mélangé. Un choc thermique doit ensuite être réalisé en exposant les tubes à une température de  $42^{\circ}\text{C}$  pendant 45 s. Les tubes sont alors immédiatement remis sur la glace pendant 2 min puis 950  $\mu\text{l}$  de milieu SOC sont ajoutés et les tubes sont finalement incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h avec une agitation de 225 rpm. Le milieu SOC est composé de 97 ml d'eau distillée auquel 2 g de bactotryptone, 0,55 g de levure, 1 ml de solution NaCl 1 M et 1ml de solution de KCl sont ajoutés. Cette solution est ensuite agitée, autoclavée et refroidie avant d'y ajouter 1 ml de solution de  $\text{Mg}^{2+}$  2 M (1 M de  $\text{MgCl}_2$  + 1 M de  $\text{MgSO}_4$ ) et 1 ml de solution de glucose 2 M puis d'être filtrée à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ . Le pH final doit être ajusté à 7,0.

Suite à l'incubation, 200  $\mu\text{l}$  de solution doivent être étalés sur les pétris qui doivent eux-mêmes être incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  de 15 à 17 h. Des colonies blanches et bleues peuvent alors être observées. Les colonies blanches contiennent généralement l'insert.

#### **5.5.2 c) *Mise en culture en milieu liquide des bactéries transformées***

Il faut tout d'abord mettre 2 ml de milieu TB + ampicilline (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dans des tubes de 15 ml, puis prélever une colonie blanche avec un cure dent et casser celui-ci dans le tube. Trois échantillons doivent être ainsi réalisés par pétri afin d'augmenter les chances d'obtenir un plasmide qui contient l'insert. Les tubes doivent être incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  avec agitation de 225 rpm pendant 15 à 17 h.

#### **5.5.2 d) *Miniprep des plasmides pGEM-T easy + insert***

Afin d'obtenir les plasmides d'intérêt, il faut utiliser un ensemble servant à faire des miniprep (QIAprep Spin Miniprep kit) (Qiagen<sup>13</sup>). La manipulation

s'effectue en transférant tout d'abord 1,5 ml de cultures bactériennes dans des tubes Eppendorf de 2,0 ml, puis en les centrifugeant 4 min à 13 000 rpm. Ensuite, le surnageant doit être discarté et le culot de bactéries doit être mélangé à 250 µl de tampon P1. Deux cents cinquante µl de tampon P2 sont ensuite ajouté et le tout doit être délicatement mélangé par inversion 4 à 6 fois. Il est important que les tubes ne soient pas vortexés. Trois cent cinquante µl de tampon N3 sont finalement ajoutés, le contenu des tubes est mélangé par inversion 4 à 6 fois afin d'éviter la précipitation localisée et les tubes sont centrifugés 10 min à 13 000 rpm. Un maximum de 800 µl de surnageant recueilli doit être transféré dans les colonnes QIAprep et elles doivent être centrifugées de 30 à 60 s à 13 000 rpm. Le surnageant doit être enlevé et les colonnes sont ensuite lavées avec 500 µl de tampon PB puis centrifugées 30 à 60 s à 13 000 rpm. Le surnageant doit de nouveau être retiré et les colonnes doivent être lavées avec 750 µl de tampon PE puis centrifugées 30 à 60 s à 13 000 rpm. Le liquide recueilli doit être discarté et les colonnes sont recentrifugées 60 s à 13 000 rpm afin d'éliminer tout le tampon PE restant. L'élution de l'ADN s'effectue en ajoutant 50 µl d'eau ultra pure au centre de la colonne puis en centrifugeant celle-ci dans un tube Eppendorf propre de 1,5 ml pendant 60 s à 13 000 rpm après une incubation de 60s.

***PRÉSENTATION ET ANALYSE DES  
RÉSULTATS***

## 6. *ISOLEMENT CELLULAIRE*

### 6.1 VIABILITÉ CELLULAIRE

**Tableau IV : Pourcentage (%) de viabilité des neutrophiles ou des leucocytes totaux avant incubation ( $T_0$ ) et après 12 h d'incubation ( $T_{12}$ ) chez les différents chevaux**

Cheval	% de viabilité des neutrophiles		% de viabilité des leucocytes totaux	
	( $T_0$ )	( $T_{12}$ )	( $T_0$ )	( $T_{12}$ )
53	99,5%	93,4%	99,6%	97,%
112	100%	100%	99,8%	97,7%
113	100%	100%	99,3%	99,1%
115	100%	99,1%	99,7%	98,1%

Les neutrophiles qui ont été isolés du sang entier par une technique de centrifugation sur gradient de densité ont un taux de viabilité de 99,5% et plus suivant l'isolement ( $T_0$ ) et de plus de 99,1% après une période d'incubation de 12 h ( $T_{12}$ ), comme le démontre le tableau IV. Les leucocytes totaux, qui ont été séparées des érythrocytes par une technique de centrifugation ont quant à eux un taux de viabilité de plus de 99,3% lors de l'isolement ( $T_0$ ) ainsi que de 97% et plus après 12 h d'incubation ( $T_{12}$ ).

## 6.2 PURETÉ CELLULAIRE

**Tableau V : Pourcentage (%) de pureté des neutrophiles dans le milieu de culture pour les différents chevaux**

Cheval	neutrophiles	lymphocytes	monocytes	éosinophiles	basophiles	% pureté
53	386	12	0	2	0	96,5%
112	380	19	1	0	0	95%
113	382	17	1	0	0	95,5%
115	383	14	2	1	0	95,8%

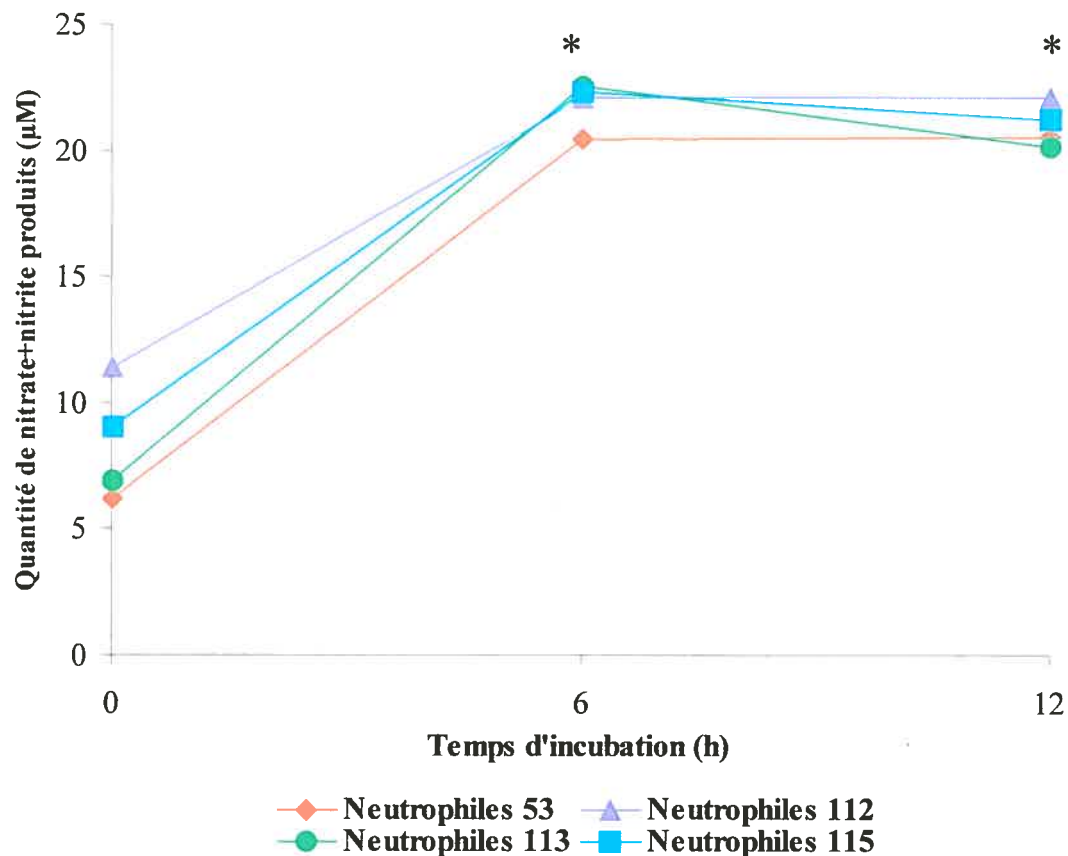
La technique d'isolement des neutrophiles sur gradient de densité utilisant le milieu iodé de type Lympholyte®-poly a permis l'obtention d'échantillons de neutrophiles dont la pureté était supérieure à 95% comme le démontre le tableau V. Bien que selon les indications fournies dans le protocole du produit il ne devrait pas y avoir de contamination par les cellules mononucléées, mais plutôt par des érythrocytes, les résultats obtenus lors des expérimentations ne sont pas concordants. En effet, aucune contamination par des érythrocytes n'a été démontrée, ce qui peut s'expliquer en raison des deux lyses érythrocytaires effectuées utilisant une solution saline très hypotonique. Toutefois, quelques cellules mononucléées (majoritairement des lymphocytes) se sont immiscées dans la suspension cellulaire. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la bande de cellules mononucléées est très dense et directement posée sur la couche de neutrophiles. Lors du prélèvement des neutrophiles, la pipette pasteur traverse la couche des autres cellules blanches pouvant ainsi augmenter les possibilités de contamination.

## 7. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE NITRITE ET NITRATE

**Tableau VI : Détermination de la concentration en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) de nitrite et nitrate produits par les neutrophiles et les leucocytes totaux en triplicatas en fonction du temps ( $T_0$ ,  $T_6$ ,  $T_{12}$ ) en heure**

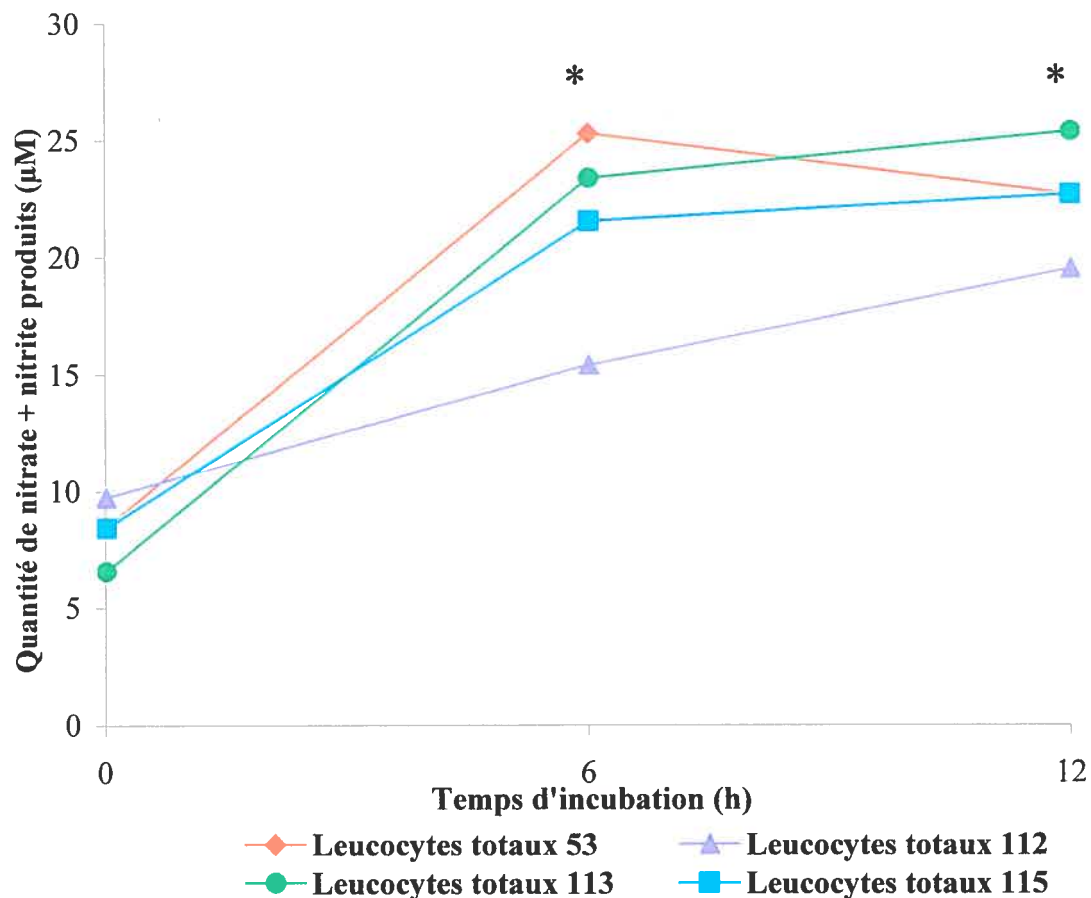
	Neutrophiles			Leucocytes totaux		
	$T_0$	$T_6$	$T_{12}$	$T_0$	$T_6$	$T_{12}$
<b>53 a</b>	7,5	20,6	20,3	9,6	25,6	22,6
<b>53 b</b>	7,4	20,4	20,1	7,9	22,6	22,0
<b>53 c</b>	3,7	20,4	21,2	7,9	27,8	23,4
<b>112 a</b>	11,8	23,0	22,5	10,3	14,4	20,9
<b>112 b</b>	11,6	21,9	22,6	8,8	15,3	18,2
<b>112 c</b>	10,9	21,5	21,2	10,1	16,6	19,4
<b>113 a</b>	8,7	22,6	20,4	7,1	23,1	25,1
<b>113 b</b>	6,0	23,0	20,1	5,7	24,0	24,0
<b>113 c</b>	6,0	22,2	19,8	6,9	23,2	27,0
<b>115 a</b>	9,6	22,6	20,6	9,1	21,5	24,2
<b>115 b</b>	9,4	22,0	22,9	7,4	20,6	22,2
<b>115 c</b>	8,2	22,3	20,3	8,8	22,6	21,6

Ce tableau démontre la quantité de nitrite et nitrate produits par les neutrophiles sanguins ou par les leucocytes totaux sanguins en fonction du temps. Les triplicatas (a, b, c) sont en fait des mesures répétées du même échantillon, effectuées lors de la technique de colorimétrie.



**Figure 9 : Graphique démontrant la quantité de nitrite et nitrate en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) produits par les neutrophiles sanguins isolés et stimulés en fonction de leur temps d'incubation (0 h, 6 h et 12 h) \* significativement différents à un  $p < 0,05$**

On note une augmentation significative de la production de nitrite et nitrate après 6 h et 12 h d'incubation par les neutrophiles sanguins stimulés aux LPS et à l'IFN- $\gamma$  chez tous les chevaux par rapport à la production détectée au temps 0, soit lorsque les cellules sont ni stimulées, ni incubées. Les points représentés sur le graphique de la figure 9 représentent la moyenne des triplicatas (a, b, et c) pour un même cheval à un temps donné. Ces résultats sont considérés significativement différents à l'aide de test de Friedman à un  $p$  de 0,047. Cependant, la production entre 6 et 12 h ne varie pas de façon significative.



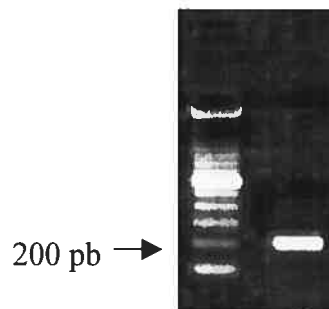
**Figure 10 :** Graphique démontrant la quantité de nitrite et nitrate en micromolaire ( $\mu\text{M}$ ) produits par les leucocytes sanguins totaux isolés et stimulés en fonction de leur temps d'incubation (0 h, 6 h et 12h) \* significativement différents à un  $p < 0,05$

Tout comme pour les neutrophiles, on observe sur ce graphique une augmentation de la production de nitrite et nitrate après 6 h d'incubation par les leucocytes sanguins stimulés aux LPS et à l'IFN- $\gamma$  chez tous les chevaux par rapport à la production détectée au temps 0. Toutefois, la production entre 6 h et 12 h ne varie pas de façon significative. Cependant, chez le cheval 112, la production des nitrite et nitrate à 6 h n'est pas aussi élevée que celle des autres chevaux.



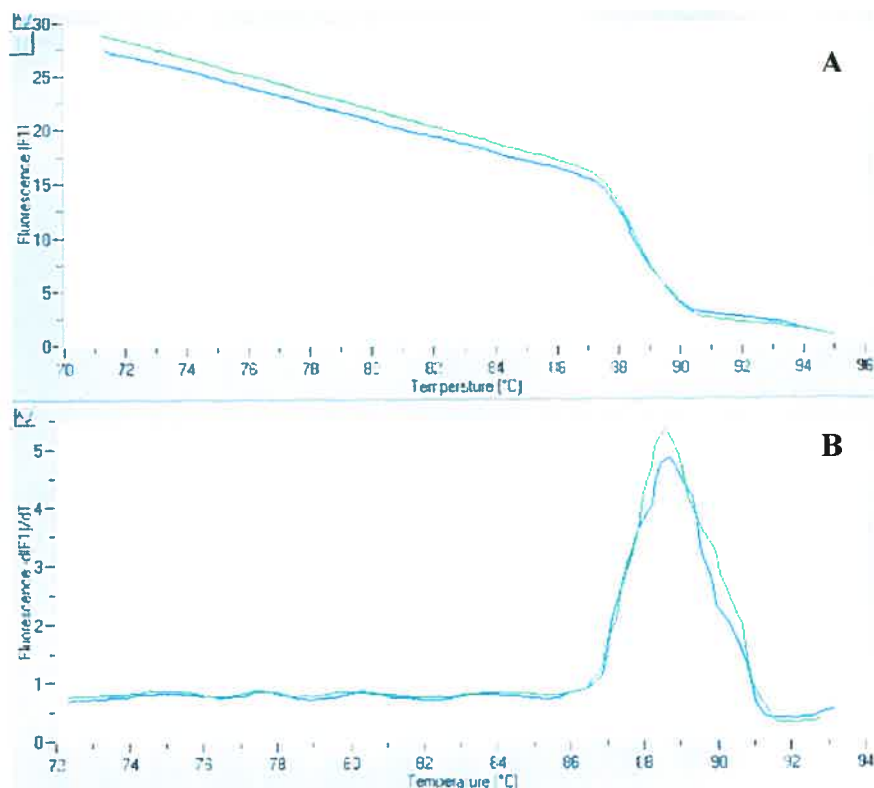
## 8. *QUANTIFICATION DE L'ARNm DE LA iNOS ÉQUINE*

Bien que de multiples manipulations ont été effectuées afin de quantifier l'ARNm de la iNOS équine, il n'a pas été possible de déterminer avec certitude si le fragment amplifié lors de la PCR en temps réel était bel et bien une portion de l'ARNm souhaitée. En effet, le fragment d'ADNc qui a été amplifié puis qui a migré sur un gel d'agarose contenait approximativement le même nombre de paire de base que la portion de la séquence d'ADN qui a servie de matrice lors de la création des amorces, tel que représenté par la figure 11.



**Figure 11 : Fragment d'ADN de iNOS équine démontré par électrophorèse**

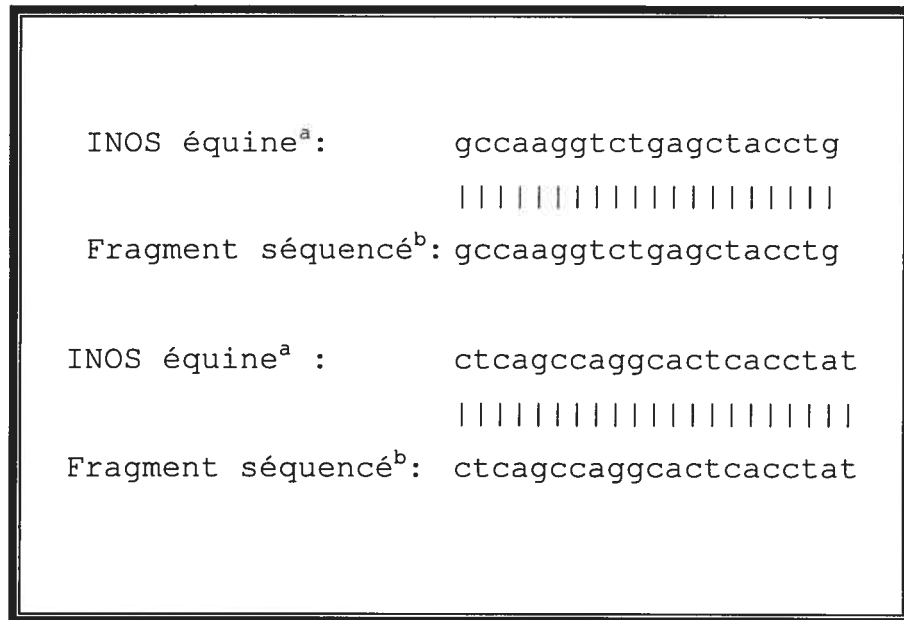
Cette figure démontre une bande d'ADN ayant approximativement 200 pb lorsque comparée à l'échelle d'ADN 1 Kb, représentant la portion d'ADN de iNOS amplifiée lors de la PCR en temps réel.



**Figure 12 : Représentation de la courbe de fusion (A) et de la courbe de la dérivé négative en fonction de la température (B) de la iNOS par RT-PCR en temps réel**

L'allure de la courbe de fusion (A) permet de démontrer la quasi inexistence de produits d'amplification non spécifiques, car sa pente est très uniforme et donc il n'y a pas divers points de fusion représentés. Le point de fusion d'un fragment d'ADN dépend de sa longueur et de sa composition en nucléotide G/C. La détermination de la température de fusion d'un fragment d'ADN peut donc être utilisée pour caractériser le produit amplifié. En effet, il était possible de remarquer de façon constante lors des diverses expérimentations, que le point de fusion du fragment d'ADN amplifié de la iNOS était situé à une température près de 89°C, tel que représenté par la figure 12 B.

Toutefois, le séquençage du fragment d'ADN, après extraction du gel d'agarose puis clonage dans un vecteur, n'a pu révéler d'homologie entre ce dit fragment et la séquence matricielle, démontrée par la figure 13.



**Figure 13 : Représentation de sections de la séquence d'ADN provenant du fragment cloné (b) accolée à la portion de séquence de la iNOS équine (a) provenant de la séquence de la iNOS équine caractérisée par Hammond (AY027883) et publiée sur Pubmed**

Les deux portions d'ADN illustrées dans la figure 13 constituent les deux brins d'ADN, soit un brin provenant de la séquence de la iNOS équine et l'autre brin, du fragment cloné. Cependant, ces portions homologues représentent en fait les deux amorces utilisées pour amplifier le segment d'ADN matriciel, signifiant que le fragment d'ADN synthétisé lors de la PCR n'est pas homologue à la séquence initiale. De plus amples manipulations devront être effectuées afin de déterminer si le fragment amplifié est en effet la séquence souhaitée.

# ***DISCUSSION GÉNÉRALE***

Les résultats de cette étude démontrent que les neutrophiles sanguins de chevaux sains ont la capacité de produire du NO avec et sans stimulation. En effet, un niveau basal des dérivés du NO a été détecté chez tous les chevaux sains utilisés dans l'étude. De plus, lorsque les neutrophiles sont stimulés *in vitro* avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$ , la production de NO est plus importante avec une valeur maximale à 6 h d'incubation et qui se prolongent jusqu'à 12 h.

La production basale de NO par les neutrophiles sanguins démontre que cette cellule possède le bagage nécessaire pour produire ce médiateur vasculaire. Cette production de NO par les neutrophiles a aussi été rapportée chez le rat et chez l'homme (Wright, Mülsch et al. 1989; Fierro, Nascimento-DaSilva et al. 1999). Les conséquences biologiques exactes de la production de NO par les neutrophiles ne sont pas clairement définies. Néanmoins, le NO produit par les neutrophiles équins pourrait signifier que cette cellule joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire et sur la modulation des cellules immunitaires lors de sepsis ou de réaction inflammatoire non-spécifique localisée. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le NO inhibe l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Kubes, Suzuki et al. 1991). Par exemple, il a été démontré que l'inhibition de la production du NO engendrait une grande augmentation dans le nombre des neutrophiles adhérents, au niveau de la circulation sanguine mésentérique chez le chat. Une autre étude a démontré chez le rat que la L-NAME augmentait le roulement des neutrophiles (Davenpeck, Gauthier et al. 1994). Ces observations dénotent que le NO, produit de façon constitutive par les cellules endothéliales, a un effet anti-inflammatoire, car il permet d'inhiber ou de limiter l'adhésion et le roulement des neutrophiles sur l'endothélium. Il est possible que le NO produit de façon sélective par les neutrophiles pourrait aussi avoir un effet anti-inflammatoire.

L'augmentation de la production de NO par les neutrophiles sanguins par l'IFN- $\gamma$  rapportée dans cette étude a aussi été rapportée dans plusieurs autres études. Il a été établi que la présence d'IFN- $\gamma$  pouvait induire ou potentialiser *in vitro*

l'induction de la iNOS par le LPS chez différentes cellules (McCall, Palmer et al. 1991 b). McCall *et al.* ont démontré que l'induction de la NOS des neutrophiles péritonéaux de rat était augmentée lors d'une stimulation avec de l'IFN- $\gamma$  [McCall, 1991 b #418]. De plus, Fierro *et al.* ont montré que la synthèse de NO était induite par l'IFN- $\gamma$  chez des neutrophiles sanguins *in vitro* (Fierro, Nascimento-DaSilva et al. 1999). En effet, ils ont démontré que l'IFN- $\gamma$  était le seul médiateur capable d'induire une grande production de NO par les neutrophiles sanguins de rat. Cette induction est variable en fonction du temps et directement corrélée avec l'augmentation de l'expression de la iNOS dans les neutrophiles.

Un des objectifs de l'étude était de mettre en évidence l'expression de l'iNOS équine par les neutrophiles sanguins et de vérifier la corrélation avec la production de NO. La technique de PCR en temps réel a permis d'amplifier une séquence d'ADN complémentaire ayant un poids moléculaire correspondant au fragment matriciel de la iNOS équine qui a été utilisée pour créer les amorces. En effet, la bande révélée sur un gel d'agarose était d'environ 200 pb, et le fragment matriciel est de 205 pb. Cependant, les résultats de séquençage n'ont pas permis de confirmer que le fragment amplifié lors de la PCR faisait parti de la séquence de iNOS équine. La raison pour laquelle aucun résultat concluant n'a été établi n'a pas été élucidée. Cependant, diverses hypothèses peuvent être avancées. Il est possible que les manipulations concernant l'insertion du fragment d'ADN dans un vecteur ainsi que le clonage de celui-ci aient été mal effectuées. En effet, ces manipulations n'ont été faites qu'une fois. Il est également possible, mais à un degré moindre, que les amorces qui ont été conçues afin de réaliser l'amplification d'une section du fragment d'ADN de la iNOS équine puissent se lier de façon spécifique ou non spécifique à d'autres portions d'ADN. Pour toutes ces raisons, il n'a pas été possible de confirmer plus précisément la présence d'iNOS produit par les neutrophiles et non plus de déterminer une modification de l'expression du gène pour la iNOS lors d'une stimulation avec du LPS et de l'IFN- $\gamma$ .

La présence de iNOS a été rapportée dans quelques articles chez le cheval. Par exemple, Tung *et al* ont rapporté la présence d'iNOS chez des chondrocytes provenant de cartilage articulaire de chevaux adultes, mis en culture et stimulés avec de l'IL-1 $\beta$  recombinant (Tung, Venta *et al.* 2002). Les résultats de cette étude présentent une relation dose-dépendante de l'expression de la iNOS lorsque les chondrocytes étaient activés ainsi qu'une augmentation de l'expression de la iNOS en fonction du temps entre 0 et 6h. Ce second phénomène a également été perçu lors de la stimulation des neutrophiles sanguins de chevaux sains, atteignant un pic de production de NO à 6 h et ce stabilisant jusqu'à 12 h, lors de nos expérimentations.

L'IFN- $\gamma$  est une cytokine inflammatoire produite principalement par les lymphocytes T et les cellules NK. Il active les macrophages afin qu'ils produisent du NO et d'autres médiateurs inflammatoires. Deux sources d'INF- $\gamma$  ont été utilisées lors des diverses manipulations. Une première source d'INF- $\gamma$  recombinant équin<sup>1</sup> n'a pas permis de démontrer une augmentation de la production des dérivés du NO en fonction du temps par les neutrophiles sanguins stimulés. Bien qu'il ait été démontré que cet INF- $\gamma$  chimérique pouvait avoir un effet biologique actif dans certaines situations, ce ne fut point le cas dans notre situation. L'utilisation d'une concentration plus faible de neutrophiles sanguins lors des expérimentations utilisant la première source d'INF- $\gamma$  pourrait être une des hypothèses pouvant expliquer l'absence de production de NO. Il est possible que le signal fût si faible que la technique utilisée n'était pas assez précise pour le détecter. De plus amples recherches n'ont pas été effectuées par la suite avec ce produit, en raison de la venue nouvelle de production commerciale d'INF- $\gamma$ .

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants structurels de la membrane des bactéries à Gram-négatif. Le rôle du LPS dans l'activation des neutrophiles équins n'a pas encore été complètement élucidé. En effet, il a été

---

<sup>1</sup>Gracieusement offert par Betsina Wagner de l'Université Cornell

démontré qu'il se liait aux neutrophiles équins, mais le mécanisme par lequel l'activation a lieu est inconnu (Weiss and Evanson 2002). L'inhalation de particules organiques contenant des produits bactériens peut engendrer certaines maladies pulmonaires. Il a été démontré que du LPS pouvait activer les macrophages alvéolaires qui sont les premiers phagocytes dans les poumons (Zeidler, Millecchia et al. 2004). L'activation des macrophages alvéolaires par le LPS engendre la sécrétion de TNF- $\alpha$ , provoquant l'infiltration des neutrophiles dans les alvéoles, l'activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B ainsi que la génération de formes réactives de l'oxygène (Shakhov, Collart et al. 1990).

Les fonctions biologiques connues du NO se divisent en deux catégories. Tout d'abord, il agit comme un messager intercellulaire pouvant réguler le tonus vasculaire, l'activation plaquettaire et la réponse immunitaire ainsi que servir de neurotransmetteur dans le cerveau et dans le système nerveux périphérique des nerfs non-adrénergiques, non-cholinergiques. Deuxièmement, le NO synthétisé en grande quantité par des macrophages, est une molécule cytotoxique impliquée dans les capacités du macrophage à tuer des bactéries, des protozoaires, des virus ainsi que des cellules tumorales. Toutefois, bien que cette fonction semble un mécanisme important dans la défense immunitaire, elle peut également avoir des effets néfastes engendrant certaines maladies autoimmunes (Moncada, Palmer et al. 1991; Moncada 1992). Alors que les nNOS et eNOS sont exprimées constitutivement, la iNOS peut être induite lors de la réponse inflammatoire par des lipopolysaccharides bactériens et par des cytokines comme le TNF- $\alpha$ , et l'IL-1 (Moncada, Palmer et al. 1991; Knowles and Moncada 1994). Bien que les mécanismes par lesquels le NO peut atténuer l'accumulation des neutrophiles ne sont pas totalement élucidés, plusieurs évidences suggèrent que le NO, sécrété par la eNOS ou la iNOS, peut moduler l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales. Il a en effet été démontré que des inhibiteurs spécifiques de la iNOS augmentent l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium en augmentant l'expression de diverses molécules d'adhésion comme



le CD11b/CD18, LEs L-, P-, E-sélectines, l'ICAM-1 ainsi que VCAM-1 (Spiecker, Darius et al. 1998; Sato, Walley et al. 1999).

Les neutrophiles jouent un rôle important dans plusieurs processus pathologiques chez le cheval. Un des modèles classiques est le souffle qui est caractérisé par une neutrophilie pulmonaire. Nous avons vu que le neutrophile est une cellule proactive capable de sécréter des cytokines et de moduler sa capacité à migrer dans le compartiment extravasculaire. Il y a plusieurs évidences expérimentales qui montrent que le NO diminuerait le flux de neutrophiles au site inflammatoire mais cela n'a pas été démontré chez le cheval. Il est permis de croire que le NO puisse jouer un rôle dans la transmigration des neutrophiles chez les chevaux atteints du souffle. Pour répondre à cette question il serait intéressant d'évaluer la cinétique de la sécrétion de NO des neutrophiles sanguins chez les chevaux atteints de souffle en phase aiguë, chronique et de rémission.

## **CONCLUSION**

Cette étude a montré que les neutrophiles sanguins équins avaient la capacité de produire de l'oxyde nitrique et cette production pouvait être modulée avec un médiateur pro-inflammatoire, l'IFN-gamma. L'impact biologique de cette production d'oxyde nitrique par les neutrophiles sanguins reste à préciser mais pourrait apporter une meilleure compréhension de la régulation du tonus vasculaire et des mécanismes de l'inflammation septique et non-spécifique par les cellules inflammatoires. Des études ultérieures permettront de mieux saisir les mécanismes de la production et de la régulation de l'oxyde nitrique par les neutrophiles sanguins dans les phénomènes inflammatoires septiques et immunitaires chez le cheval.

D'autres études *in vitro*, utilisant des inhibiteurs de la iNOS comme le L-NMMA, le L-NAME et des corticostéroïdes tels que la dexaméthasone devront être réalisées afin de déterminer si le NO produit par les neutrophiles est bel et bien synthétisé par la iNOS plutôt que par un autre type de NOS, et de comprendre par quelle voie signalétique il est produit.

# ***SOURCES DOCUMENTAIRES***

- Akaike, T., Y. Noguchi, S. Ijiri, K. Setoguchi, M. Suga, Y. M. Zheng, B. Dietzschold and H. Maeda (1996). "Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals." Proceedings of the National Academy of the United States of America **93**: 2448-2453.
- Babior, B. M. (1984). "Oxidants from phagocytes: Agents of defence and destruction." Blood **64**: 959-966.
- Baehner, R. (2000). "Neutrophil structure and function in Hematology: Basic Principles and Practice." **chapitre 38**: 667-669.
- Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994). "Fuction and activation of NF- $\kappa$ B in the immune system." Annual Review of Immunology **12**: 141-179.
- Baggiolini, M., A. Walz and S. L. Kunkel (1989). "Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils." Journal of Immunology **84**: 1045-1049.
- Barnes, P. J. and F. W. Liew (1995). "Nitric oxide and asthmatic inflammation." Immunology Today **16**: 128-130.
- Beech, J. (1991). "Chronic Obstructive pulmonary disease." Veterinary Clinics of North America: Equine Practice **7(1)**: 79-91.
- Berman, M. E. and W. A. Muller (1995). "Ligation of platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18)." Journal of Immunology **154**: 299-307.

- Bertram, T. A. (1985). "Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals." Advances in veterinary Science and comparative Medicine **30**: 91-129.
- Bevilacqua, M. P. and R. M. Nelson (1993). "Selectins." Journal of Clinical Investigation **91**: 379-387.
- Bevilacqua, M. P., S. Stenglelin, M. A. J. Gimbrone and B. Seed (1989). "Endothelial leucocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins." Science **243**: 1160-1165.
- Blixt, A., P. Jonsson, M. Braide and U. Bagge (1985). "Microscopic studies on the influence of erythrocyte concentration on the post-junctional radial distribution of leukocytes at small venular junctions." International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental **4**: 141-156.
- Boggs, D. (1967). "The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease." Seminars in Hematology **4**: 359-386.
- Borland, C. D. R. and T. W. Higginbottom (1989). "A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide." European Respiratory Journal **2**: 56-63.
- Borregaard, N., K. Løllike, L. Jørgensen, H. Sengeløv, L. Bastholm, M. H. Nielsen and D. F. Bainton (1993). "Human neutrophil granules and secretory vesicles." European Journal of Haematology **51**: 187-198.
- Botha, A. J., F. A. Moore, E. E. Moore, B. Fontes, A. Banerjee and V. M. Peterson (1995). "Postinjury neutrophil priming and activation states: therapeutic challenges." Shock **3**: 157-166.

- Brown, E. J. and F. P. Lindberg (1996). "Leucocyte adhesion molecules in host defence against infection." Annals of Medicine **28**: 201-208.
- Bryant, C. E. and J. Elliott (1994). "Nitric oxide: friend or foe?" Equine Veterinary Journal **6**(2): 59-64.
- Burns, A. R., D. C. Walker, E. S. Brown, L. T. Thurmon, R. A. Bowden, C. R. Keese, S. I. Simon, M. L. Entman and C. W. Smith (1997). "Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners." Journal of Immunology **159**: 2893-2903.
- Cartwright, J. E., A. P. Johnstone and G. S. J. Whitley (1997). "Inhibition of nitric oxide synthase by antisense techniques: investigation of the roles of NO produced by murine macrophages." British journal of pharmacology **120**: 146-152.
- Cassatella, M. A. (1999). "Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound." Advances in Immunology **73**(369-509).
- Cassatella, M. A., S. Gasperini and M. P. Russo (1997). "Cytokine expression and release by neutrophils." Annals New York academy of sciences **832**: 233-242.
- Cassatella, M. A. (1995). "The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils." Immunology Today **16**(1): 21-26.
- Chapman, P. F., C. M. Atkins, M. T. Allen, J. E. Haley and J. E. Steinmetz (1992). "Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning." Neuroreport **3**: 567-570.

- Cho, H. J., Q. W. Xie, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee and C. Nathan (1992). "Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages." Journal of Experimental Medicine **176**: 599-604.
- Collingridge, G. L., S. J. Kehl and H. McLennan (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." Journal of Physiology **334**: 33-46.
- Costa, L. R. R., T. L. Seahorn, R. M. Moore, J. L. Oliver and G. L. Hosgood (2001). "Plasma and bronchoalveolar fluid concentrations of nitric oxide and localization of nitric oxide synthesis in the lungs of horses with summer pasture associated obstructive pulmonary disease." American Journal of Veterinary Research **62**(9): 1381-1386.
- Cronstein, B. N. and G. Weissmann (1993). "The adhesion molecules of inflammation." Arthritis & Rheumatism **36**: 147-157.
- Dal Secco, D., J. A. Paron, S. H. P. de Oliveira, S. H. Ferreira, J. S. Silva and F. Q. Cunha (2004). "Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis." Nitric Oxide **9**: 153-164.
- Davenpeck, K. L., T. W. Gauthier and A. M. Lefer (1994). "Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation." Gastroenterology **107**: 1050-1058.
- De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. J. Gimbrone, W. S. Shin and J. K. Liao (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." Journal of Clinical Investigation **96**: 60-68.



- Deguchi, T. and M. Yoshioka (1982). "L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells." Journal of Biological Chemistry **257**: 10147-10152.
- Derksen, F. J. (1993). "Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition [editorial]." Equine Veterinary Journal **25**(4): 257-258.
- Derksen, F. J. (1991). Chronic obstructive pulmonary disease. Equine Respiratory Disorders. J. Beech. Philadelphia, Lea & Febiger: 223-235.
- Dötsch, J., E. Schoof and W. Rascher (2004). Quantitative TaqMan Real-time PCR: Diagnostic and Scientific Applications. Molecular Analysis and Genome Discovery. R. Rapley and S. Harbron, John Willey & Son, Ltd: 17-28.
- Downey, G., G. S. Worthen, P. M. Henson and D. M. Hyde (1993). "Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum." Am Rev Respir Dis **147**: 168-176.
- Efron, D. T., S. J. Kirk, M. C. Regan, H. L. Wasserkrug and A. Barbul (1991). "Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis." Surgery **110**: 327-334.
- Fierro, I. M., V. Nascimento-DaSilva, M. A. B. Arruda, M. S. Freitas, M. C. Plotkowski, F. Q. Cunha and C. Barja-Fidalgo (1999). "Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity." Journal of Leukocyte Biology **65**: 508-514.

- Ford, T. C. and J. M. Graham (1991). An introduction to centrifugation. Oxford, BIOS Scientific Publishers.
- Foxman, E. F., J. J. Campbell and E. C. Butcher (1997). "Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis." Journal of Cell Biology **139**: 1349-1360.
- Frean, S. P., C. E. Bryant, I. L. Fröling, J. Elliott and P. Lees (1997). "Nitric oxide production by equine articular cells *in vitro*." Equine Veterinary Journal **29**(2): 98-102.
- Freeman, W. M., S. J. Walker and K. E. Vrana (1999). "Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential." BioTechniques **26**: 112-125.
- Fukatsu, K., H. Saito, I. Han, S. Furukawa, M. T. Lin, T. Matsuda, S. Ikeda, T. Inoue, H. Yasuhara and T. Muto (1997). "Nitric oxide inhibition decreased neutrophil adhesion at the inflammatory site, while increasing adhesion in remote organs in peritonitis." Journal of Surgical Research **68**: 79-86.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**: 373-376.
- Garg, U. C. and A. Hassid (1989). "Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells." Journal of Clinical Investigation **83**: 1774-1777.

- Gelfand, D. H. (1989). *Taq* DNA polymerase. PCR Technology. Principles and Amplifications for DNA Amplification. H. Erlich. New York, Stockton press: 17-22.
- Geller, D. A., M. E. de Vera, D. A. Russell, R. A. Shapiro, A. K. Nussler, R. L. Simmons and T. R. Billiar (1995). "A central role for IL-1 beta in the *in vitro* and *in vivo* regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase." Journal of Immunology **155**: 4890-4898.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1982). "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids." Analytical Biochemistry **126**: 131-138.
- Hammond, R. A., R. J. Flower and C. E. Bryant (2002). "Complete coding sequence of equine inducible nitric oxide synthase." Research in Veterinary Science **72**: 245.
- Hammond, R. A., R. Hannon, S. P. Frean, S. J. Armstrong, R. J. Flower and C. E. Bryant (1999). "Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages." American Journal of Veterinary Research **60**(4): 426-431.
- Heiss, L. N., J. R. Lancaster, J. A. Corbett and W. E. Goldman (1994). "Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis." Proceedings of the National Academy of the United States of America **91**: 267-270.
- Hibbs, J. B., Jr., Z. Vavrin and R. R. Taintor (1987 b). "L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells." Journal of Immunology **138**: 550-565.

- Hickey, M. J. (2001). "Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment." Clinical science **100**: 1-12.
- Hori, K., P. R. Burd, K. Furuke, J. Kutza, K. A. Weih and K. A. Clouse (1999). "Human immunodeficiency virus-1-infected macrophages induce inducible nitric oxide synthase and nitric oxide (NO) production in astrocytes: astrocytic NO as a possible mediator of neuronal damage in acquired immunodeficiency syndrome." Blood **93**: 1843-1850.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**: 766-771.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." Cell **48**: 549-554.
- Ignarro, L. J. (1989). "Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins." Seminars in Hematology **26**: 63-76.
- Ignarro, L. J., R. E. Byrns, G. M. Buga and K. S. Wood (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circulation Research **61**: 866-879.
- Ignarro, L. J., B. Ballot and K. S. Wood (1984). "Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins." Journal of Biological chemistry **259**: 6201-6207.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik (2001). Immunobiology The immune system in health and disease. New York, Garland Publishing.

- Janssens, S. P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Bloch and K. D. Bloch (1992). "Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relating factor/nitric oxide synthase." Journal of Biological chemistry **267**: 14519-14522.
- Johnston, B., S. Kanwar and P. Kubes (1996). "Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including nitric oxide." American Journal of Physiology **271**: H614-H621.
- Joubert, P., D. W. Silversides and J.-P. Lavoie (2001). "Equine neutrophils express mRNA for tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, macrophage-inflammatory-protein-2 but not for IL-4, IL-5 and interferon- $\gamma$ ." Equine Veterinary Journal **33**(7): 730-733.
- Katsuki, S., W. P. Arnold and F. Murad (1977). "Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues." J Cyclic, Nucleotide Res. **3**: 239-247.
- Kirk, S. J., M. C. Regan and Barbul (1990). "Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide." Biochemical and biophysical research communications **173**: 660-665.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochemical Journal **298**: 249-258.
- Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. J. Palmer and S. Moncada (1989). "Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase." Proceedings of the National Academy of the United States of America **86**: 5159-5162.

- Kobzik, L., D. Bredt, C. Lowenstein, S. H. Snyder, J. M. Drazen, D. Sugarbaker and J. S. Stamler (1993). "Nitric oxide synthase in human and rat lung." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **9**: 371-377.
- Krukoff, T. L. (1998). "Central regulation of autonomic function: no brakes?" Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **25**: 474-478.
- Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proceedings of the National Academy of the United States of America **88**: 4651-4655.
- Kuhnle, G. E. H., W. M. Kuebler, J. Groh and A. E. Goetz (1995). "Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **152**: 1221-1228.
- Lamas, S., P. A. Marsden, G. K. Li, P. Tempst and T. Michel (1992). "endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform." Proceedings of the National Academy of the United States of America **89**: 6348-6352.
- Lavoie, J.-P., K. Maghni, M. Desnoyers, R. Taha, J. G. Martin and Q. A. Hamid (2001). "Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **164**(8): 1410-1413.
- Lee, D. K. H., D. Faunce, D. E. Henry, R. J. Sturm and T. J. Rimele (1988). "Rat polymorphonuclear leukocytes (PMN) increase cGMP levels in rat aorta." FASEB Journal **2**(A518).

- Liew, F. W. and F. E. Cox (1991). "Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide." Immunology Today **12**(A17-A21).
- Liew, F. Y., Y. Li, A. Severn, S. Millot, J. Schmidt, M. Salter and S. Moncada (1991). "A possible novel pathway of regulation by murine T helper type 2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages." European Journal of Immunology **21**: 2489-2494.
- Lirk, P., G. Hoffmann and J. Rieder (2002). "Inducible Nitric Oxide Synthase- Time for Reappraisal." Inflammation and Allergy **1**: 89-108.
- Lloyd, A. R. and J. J. Oppenheim (1992). "Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response." Immunology Today **13**: 169-172.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira and Darnell (1997). Biologie moléculaire de la cellule, DeBoeck Université.
- Maeda, H. and T. Akaike (1998). "Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer." Biochemistry **63**: 854-865.
- Malech, H. L. and J. I. Gallin (1987). "Neutrophils in human diseases." The New England Journal of Medicine **317**: 687-694.
- Malinski, T. and Z. Taha (1992). "Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrin-based microsensor." Nature **358**: 676-678.

- Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf and J. S. Wishnok (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate." Biochemistry **27**: 8706-8711.
- Marr, K. A., P. Lees and F. M. Cunningham (2002). "Antigen challenge increases adherence of circulating neutrophils in horses with chronic obstructive pulmonary disease." Equine Veterinary Journal **34**(1): 65-70.
- McCall, T. B., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1992). "Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils." Biochemical and biophysical research communications.
- McCall, T. B., M. Feelisch, R. M. J. Palmer and S. Moncada (1991 a). "Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells." British journal of pharmacology **102**: 234-238.
- McCall, T. B., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1991 b). "Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone." European Journal of Immunology **21**(10): 2523-2527.
- McCall, T. B., N. K. Broughton-Smith, R. M. J. Palmer, B. J. R. Whittle and S. Moncada (1989). "Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. release and interaction with superoxide anions." Biochemical Journal **261**: 293-296.
- McEver, R. P., J. H. Beckstead, K. L. Moore, L. Marshall-Carlson and D. F. Bainton (1989). "GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies." Journal of Clinical Investigation **84**: 92-99.



- Miki, N., Y. Kawabe and K. Kuriyama (1977). "Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide." Biochemical and biophysical research communications **75**: 851-856.
- Moilanen, E. and H. Vapaatalo (1995). "Nitric oxide in inflammation and immune response." Annals of Medicine **27**: 359-367.
- Moncada, S. and E. A. Higgs (1995). "Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide." FASEB Journal **9**: 1319-1330.
- Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." The New England Journal of Medicine: 2002-2012.
- Moncada, S. (1992). "The L-arginine: nitric oxide pathway." Acta Physiologica Scandinavica **145**: 201-227.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology." Pharmacological reviews **43**(2): 109-142.
- Moore, K. W., A. O'Garra, R. de Waal Malefyt, P. Vieira and T. R. Mosmann (1993). "Interleukin-10." Annual Review of Immunology **11**: 165-190.
- Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng and D. M. Phillips (1993). "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." Journal of Experimental Medicine **178**: 449-460.
- Nathan, C. and Q.-W. Xie (1994 b). "Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls." Cell **78**: 915-918.

- Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." FASEB Journal **6**: 3051-3064.
- Oste, C. (1989). PCR automation. PCR technology Principles and Applications for DNA Amplification. H. Erlich. New York, Stockton press: 23-30.
- Owen, C. A., M. A. Campbell, S. S. Boudekes and E. J. Campbell (1995 a). "Inducible binding of bioactive cathepsin G to the cell surface of neutrophils." Journal of Immunology **155**: 5803-5810.
- Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boudekes and E. J. Campbell (1995 b). "Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases." Journal of Cell Biology **131**: 775-779.
- Palmer, R. M. J. and S. Moncada (1989). "A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells." Biochemical and biophysical research communications **158**: 348-352.
- Palmer, R. M. J., D. S. Ashton and S. Moncada (1988 a). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**: 664-666.
- Palmer, R. M. J., D. D. Rees, D. S. Ashton and S. Moncada (1988 b). "L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependant relaxation." Biochemical and biophysical research communications **153**: 1251-1256.
- Pardi, R. (1994). "Inside-out and outside-in mechanisms in leukocyte adhesion." Fundamental and clinical immunology **2**: 135-146.

- Park, C. S., G. Krishna, M. S. Ahn, J. H. Kang, W. G. Chung, D. J. Kim, H. K. Hwang, J. N. Lee, S. G. Paik and Y. N. Cha (2000). "Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues." Nitric Oxide **4**: 459-471.
- Peng, H. B., P. Libby and J. K. Liao (1995). "Induction and stabilization of I $\kappa$ B- $\alpha$  by nitric oxide mediates inhibition of NF- $\kappa$ B." Journal of Biological Chemistry **270**: 14214-14219.
- Pollanen, J., O. Saksela, E. Salonen, P. Andreasen, L. Nielsen, K. Dano and A. Vaheri (1987). "Distinct localizations of urokinase-type plasminogen activator and its type 1 inhibitor under cultured human fibroblasts and sarcoma cells." Journal of Cell Biology **104**: 1085-1096.
- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1990). "Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." Proceedings of the National Academy of the United States of America **87**: 10043-10047.
- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1990 a). "An L-arginine:nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation." Proceedings of the National Academy of the United States of America **87**: 5193-5197.
- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1987 a). "Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets." British journal of pharmacology **92**: 181-187.

- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1987 b). "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide." British journal of pharmacology **92**: 639-646.
- Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1987 c). "The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium." Biochemical and biophysical research communications **148**: 1482-1489.
- Rand, M. J. (1992). "Nitrgenic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **19**: 147-169.
- Reinhold, M. R., F. P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M. G. Peters and E. J. Brown (1995). "*In vivo* expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47)." Journal of Cell Science **108**: 3419-3425.
- Ricciardolo, F. L. M., P. J. Sterk, B. Gaston and G. Folkerts (2004). "Nitric oxide in health and disease of the respiratory system." Physiological Reviews **84**: 731-765.
- Rimele, T. J., R. J. Sturm, L. M. Adams, D. E. Henry, R. J. Heaslip, B. M. Weichman and D. Grimes (1988). "Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **245**(1): 102-111.
- Robinson, N. E. (2001). "International Workshop on Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University, June 16-18, 2000." Equine Veterinary Journal **33**(1): 5-19.

- Robinson, N. E., M. A. Olszewski, D. Boehler, C. Berney, J. Hakala, C. Matson and F. J. Derksen (2000). "Relationship between clinical signs and lung function in horses with recurrent airway obstruction (heaves) during a bronchodilator trial." Equine Veterinary Journal **32**(5): 393-400.
- Roman, A., R. LeGallo and E. D. McGrahen (2004). "Blocking of endogenous nitric oxide increases white blood cell accumulation in rat lung." Journal of Pediatric Surgery **39**: 48-52.
- Saiki, R. K. (1989). The design and Optimization of the PCR. PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification. H. Erlich. New York, Stockton Press: 7-16.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of Beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**: 1350-1354.
- Salter, M., R. G. Knowles and S. Moncada (1991). "Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases." FEBS Letters **291**: 145-149.
- Sato, Y., K. R. Walley and M. E. Klut (1999). "Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD18 expression." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **159**: 1469-1476.
- Schmid-Schonbein, G. W., S. Usami, R. Skalak and S. Chien (1980). "The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels." Microvascular Research **19**: 45-70.

- Seely, A. J. E., J. L. Pascual and N. V. Christou (2003). "Science review: cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance." Critical Care **7**: 291-307.
- Sessa, W. C., C. M. Barber and K. R. Lynch (1993). "Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein." Circulation Research **72**(921-924).
- Shakhov, A. N., M. A. Collart, P. Vassalli, S. A. Nedospasov and C. V. Jongeneel (1990). "Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages." Journal of Experimental Medicine **171**: 35-47.
- Smith, J. A. (1994). "Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword." Journal of Leukocyte Biology(56).
- Spiecker, M., H. Darius, K. Kaboth, F. Hubner and J. K. Liao (1998). "Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants." Journal of Leukocyte Biology **63**: 732-739.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." Cell **76**: 301-314.
- Springer, T. A. (1990). "Adhesion receptors of the immune system." Nature **346**: 425-433.
- Stuehr, D. J. and M. A. Marletta (1987 a). "Induction of nitrite/nitrate in murine macrophage by BCG infection, lymphokines or interferon-g." Journal of Immunology **139**: 518-525.

- Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen and P. Engel (1995). "The selectins: vascular adhesion molecules." FASEB Journal **9**: 866-873.
- Thomas, D. D., X. Liu, S. P. Kantrow and J. R. J. Lancaster (2001). "The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>." Proceedings of the National Academy of the United States of America **98**: 355-360.
- Tung, J. T., P. J. Venta and J. P. Caron (2002). "Inducible nitric oxide expression in equine articular chondrocytes: effects of antiinflammatory compounds." Osteoarthritis and Cartilage **10**: 5-12.
- Varani, J. and P. A. Ward (1994). "Mechanisms of neutrophil-dependent and neutrophil-independent endothelial cell injury." Biol Signals **3**: 1-14.
- Vodovotz, Y., N. S. Kwon, M. Pospichil, J. Manning, J. Paik and C. Nathan (1994). "Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide." Journal of Immunology **152**: 4110-4118.
- Waldman, S. A. and M. F. (1988). "Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system." Journal of Cardiovascular Pharmacology **12 Suppl 5**: S115-S118.
- Weiss, D. J. and B. S. Evanson (2002). "Evaluation of lipopolysaccharide-induced activation of equine neutrophils." American Journal of Veterinary Research **63**: 811-815.
- Weiss, S. J. (1989). "Tissue destruction by neutrophils." The New England Journal of Medicine **320(6)**: 365-376.

- Wheater, P. R., B. Young and J. W. Heath (2001). Histologie fonctionnelle. Paris, De Boeck Université.
- Wright, C. D., A. Mülsch, R. Busse and H. Osswald (1989). "Generation of nitric oxide by human neutrophils." Biochemical and biophysical research communications **160**(2): 813-819.
- Xu, W., I. G. Charles, S. Moncada, P. Gorman, D. Sheer, L. Liu and P. Emson (1994). "Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively." Genomics **21**: 419-422.
- Xu, W., P. Gorman, D. Sheer, G. Bates, J. Kishimoto, L. Lizhi and P. Emson (1993). "Regional localization of the gene coding for human inducible nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-->24.31 by fluorescent in situ hybridization." Cytogenetic and Genome Research **64**: 62-63.
- Yang, J., T. Hirata, K. Croce, G. Merrill-Skoloff, B. Tchernychev, E. Williams and R. I. Flaumenhaft (1999). "Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration." Journal of Experimental Medicine **190**: 176-178.
- Zeidler, P. C., L. M. Millecchia and V. Castranova (2004). "Role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in lipopolysaccharide plus interferon- $\gamma$ -induced pulmonary inflammation." Toxicology and Applied Pharmacology **195**: 45-54.



Zimmerman, G. A., S. M. Prescott and T. M. McIntyre (1993). Platelet-activating factor. Inflammation: basic principles and clinical correlates. J. I. Gallin, A. L. Goldstein and R. Snyderman. New York, Raven Press: 149-176.

***ANNEXE***

**ADRESSES DES FABRICANTS****<sup>1</sup>Cedarlane Laboratories Ltd.**

5516, 8th Line R.R.#2,  
Hornby, Ontario, Canada  
L0P 1E0

**<sup>2</sup>Invitrogen Canada Inc.**

2270 Industrial St  
Burlington, Ontario, Canada  
L7P 1A1

**<sup>3</sup>Fisher Scientific Limited**

112 Colonnade Road  
Nepean, Ontario, Canada  
K2E 7L6

**<sup>4</sup>Bekman Coulter Canada Inc.**

6755 Mississauga Road, Suite 600  
Mississauga, Ontario, Canada  
  
L5N 7Y2

**<sup>5</sup>Ultident**

4850 chemin bois franc # 100  
St-Laurent, Québec, Canada  
H4S 1A7

**<sup>6</sup>Reichert Ophthalmic Instruments**

3374 Walden Ave.  
NY 14043 États-Unis

**<sup>7</sup>Sigma-Aldrich Canada Ltd.**

2149 Winston Park Drive  
Oakville, Ontario, Canada  
L6H 6J8

**<sup>8</sup>R&D Systems Inc.**

614 McKinley Place N.E.  
Minneapolis, MN 55413 États-Unis

**<sup>9</sup>Cayman Chemical**

1180 East Ellsworth Road  
Ann Arbor, Michigan 48108 États-Unis

**<sup>10</sup>Millipore**

36 Antares Drive Suite 280  
Nepean, Ontario, Canada  
K2E 7W5

**<sup>11</sup>Roche Diagnostics**

201, Boulevard Armand-Frappier  
Laval, Québec, Canada  
H7V 4A2

**<sup>12</sup>Amersham Biosciences**

500 Morgan Boulevard  
Baie d'Urfe, Québec, Canada  
H9X 3V1

<sup>13</sup>**Qiagen**

2800 Argentia Road, Unit 7  
Mississauga, Ontario, Canada  
L5N 8L2

<sup>14</sup>**Promega**

2800 Woods Hollow Road  
Madison WI 53711, États-Unis

