

Université de Montréal

L'expression temporelle des gènes pour la THBS2, le LUM et
le SPARC durant la guérison cutanée chez le cheval

par

Kevin Raphaël

Département de biomédecine vétérinaire

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 biomédecine

Août, 2006

©Kevin Raphaël, 2006



SF

607

US4

2006

v.031



Direction des bibliothèques

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

L'expression temporelle des gènes pour la THBS2, le LUM et
le SPARC durant la guérison cutanée chez le cheval

présenté par
Kevin Raphaël

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Christopher Price, président-rapporteur

Dre Christine L. Theoret, directrice de recherche

Dr. Jacques G. Lussier, codirecteur

Dr. Daniel Jean, membre du jury

Résumé

Introduction : La guérison cutanée est un processus auquel sont associées plusieurs complications chez le cheval. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant la guérison permettrait le développement d'approches innovatrices pour le traitement de plaies. De récentes études d'expression génique ont permis d'identifier les fragments d'ADNc de THBS2, SPARC et LUM dans des plaies de 7 jours chez le cheval.

Objectif : L'objectif de cette étude était de caractériser la partie codante complète de THBS2, SPARC et LUM de façon à analyser l'expression de leur ARNm durant la guérison de plaies normales ou pathologiques chez le cheval.

Hypothèse : Nous avons postulé que l'ARNm de THBS2, SPARC et LUM seraient sur-exprimés dans des plaies thoraciques guérissant normalement comparativement aux plaies appendiculaires qui tendent vers une guérison retardée.

Méthodologie : Le "Northern" virtuel et la mini-génothèque d'ADNc ont permis la détermination du poids moléculaire du transcrit, le clonage de l'ADNc et sa caractérisation par séquençage. L'expression temporelle de l'ARNm a été analysée par RT-PCR semi-quantitatif.

Résultats : L'ADNc de la partie codante du LUM et de SPARC équins a été complètement caractérisé, tandis que celui de THBS2 l'est partiellement. L'expression temporelle de THBS2 démontre une sur-expression aux plaies thoraciques par rapport aux membres lors des semaines 1, 2, 3 et 6. Le transcrit de SPARC est sur-exprimé au thorax par rapport aux plaies des membres. Les plaies aux membres non bandés sous-expriment LUM par rapport au thorax et aux membres bandés lors des semaines 1 et 6.

Conclusion : L'expression temporelle de l'ARNm de THBS2, SPARC et LUM ont démontré des patrons distincts. Cependant une interprétation est

difficile puisque ces gènes auraient des actions dans les trois phases de la guérison. Des recherches sur l'expression protéique sont présentement en cours dans le but de corroborer et expliciter nos données géniques.

Mots clés : guérison; cheval; thrombospondin-2; lumican; SPARC; expression génique; northern virtuel.

Abstract

Introduction : Wound healing is a process known to be fraught with complications in the horse. Improved understanding of the biochemical mechanisms underlying repair may lead to innovative and successful approaches to wound management. Gene expression profiling studies recently identified THBS2, SPARC and LUM cDNA fragments in 7-day old wounds of horses.

Objective : The objective of this study was to characterize the complete coding sequence of THBS2, SPARC and LUM in order to analyze their mRNA expression during normal and pathological wound healing in the horse.

Hypothesis : It was postulated that mRNA for THBS2, SPARC and LUM will be over-expressed in trunk wounds that heal normally compared to limb wounds in which there is a tendency towards delayed healing.

Methodology : Virtual northern analyses and size-selected cDNA libraries were used to determine the size of the transcript, to clone and characterize by sequencing their respective cDNA. Thereafter, temporal expression of mRNA was analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

Results : The coding sequences of equine LUM and SPARC cDNA were completely characterized, while a partial sequence was worked out for THBS2. THBS2 mRNA was over-expressed in thoracic wounds at weeks 1, 2, 3 and 6 compared to limb wounds. The SPARC transcript also showed over-expression in thoracic wounds when compared to limb wounds. Wounds from the unbandaged limb group under-expressed LUM at weeks 1 and 6 compared to those from thorax and bandaged limb wounds.

Conclusion : While each gene showed a distinct pattern of expression, this is difficult to analyze because the genes have a role in more than one phase of repair. We have recently undertaken protein expression studies in an attempt to explain the molecular data revealed herein.

Key words: wound healing; horse; thrombospondin-2; lumican; SPARC; genetic expression; virtual northern.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES FIGURES	XV
REMERCIEMENTS	XVI
INTRODUCTION	17
1 RÉCENSION DE LA LITTÉRATURE	18
1.1 PHYSIOLOGIE DE LA GUÉRISON CUTANÉE NORMALE	18
1.1.1 PHASE INFLAMMATOIRE	18
1.1.1.1 LES PLAQUETTES	18
1.1.1.2 LES NEUTROPHILES	19
1.1.1.3 LES MACROPHAGES	20
1.1.2 PHASE PROLIFÉRATIVE	21
1.1.2.1 ÉPITHÉLIALISATION	21
1.1.2.2 FIBROPLASIE	22
1.1.2.3 ANGIOGÉNÈSE	23
1.1.2.4 CONTRACTION	24
1.1.3 PHASE DE REMODELAGE	25
1.2 GUÉRISON CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL	26
1.3 CONTRÔLE GÉNIQUE DE LA GUÉRISON	30
1.4 LES GÈNES À L'ÉTUDE : THBS2, SPARC ET LUM	33
1.4.1 "THROMBOSPONDIN-2" (THBS2)	33
1.4.2 "SECRETED PROTEIN, ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE" (SPARC)	38
1.4.3 LUMICAN (LUM)	43
1.5 HYPOTHÈSE ET OBJECTIF	49
2 MÉTHODOLOGIE	50
2.1 MODÈLE ANIMAL ET ÉCHANTILLONS	50
2.2 EXTRACTION DE L'ARN	51
2.3 PRÉPARATION DES SONDÉS	52
2.4 ANALYSE PAR "NORTHERN" VIRTUEL	54
2.5 MINI-GÉNOTHÈQUE	56
2.5.1 FABRICATION DE LA MINI-GÉNOTHÈQUE D'ADNC	56
2.5.2 CLONAGE	57
2.5.3 CRIBLAGE DE LA MINI-GÉNOTHÈQUE D'ADNC	57
2.6 SÉQUENÇAGE ET ANALYSE D'HOMOLOGIE	59
2.7 ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE TEMPORELLE (PAR RT-PCR SEMI-QUANTITATIF)	61
2.8 ANALYSE STATISTIQUE	61

3	RÉSULTATS _____	62
3.1	CLONAGE ET CARACTÉRISATION DE L'ADNC ÉQUIN POUR THBS2, SPARC ET LUM _____	62
3.2	EXPRESSION TEMPORELLE DE L'ADNC POUR THBS2, SPARC ET LUM LORS DE LA GUÉRISON DE PLAIES CUTANÉES THORACIQUES, AUX MEMBRES ET LORS DE L'INDUCTION EXPÉRIMENTALE D'UN BOUTON DE CHAIR _____	72
4	DISCUSSION _____	78
5	CONCLUSION _____	85
6	BIBLIOGRAPHIE _____	86

Liste des abréviations

5' RACE :	Amplification rapide des extrémités 5' de l'ADNc
α -SMA :	α -smooth muscle actin
μ g :	Microgramme
μ L :	Microlitre
μ M :	Micromolaire
aa :	Acides aminés
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc ou cDNA :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADRB2 :	Adrenergic, beta-2-, receptor, surface
ARN ou RNA :	Acide ribonucléique
ARNm ou mRNA :	Acide ribonucléique messenger
BB1 :	Basogranulin
BM-40 :	Basement-membrane protein 40
BP :	Bord de plaie
CCPA :	Conseil canadien de protection des animaux
CD36 :	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
cm :	Centimètre
cm ² :	Centimètre carrée
COMP :	Cartilage oligomeric matrix protein
CRSNG :	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
CSF-1 :	Colony stimulating factor 1
CSF1R :	Colony stimulating factor 1 receptor
CSF2 :	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
DD-PCR :	Affichage différentiel de la réaction en chaîne de polymérase
D.O. :	Densité optique
DS :	Dermatane sulfate
E :	Valeur statistique

EC :	Extracellulaire
EDTA :	Acide éthylène-diamine-tétracétique
EGF :	Epidermal growth factor
EtBr :	Bromure d'éthidium
FGF1 :	Acidic fibroblast growth factor
FGF2 :	Basic fibroblast growth factor
FGF7 :	Fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
FOS :	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
GAG :	Glycosaminoglycane
GAPDH :	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GHK :	Séquence de glycine, d'histidine et de lysine
HLA-DR :	Human leukocyte antigen-D-related
HOXB13 :	Homeobox B13
IFN :	Interferon
IFNA :	Interferon, alpha
IFNG :	Interferon, gamma
IL1 :	Interleukin 1
IL1B :	Interleukin 1, beta
IL3 :	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
I.V.:	Intra-veineux
JUN :	Jun oncogene
Kan :	Kanamycine
kb :	Kilobase
kDA :	Kilodalton
KO :	Knockout
LB :	Luria-Bertani
LDLR :	Low density lipoprotein receptor
LPR :	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LRR :	Répétitions riches en leucines
LUM :	Lumican
LUM ^{-/-}	Souris invalidées pour LUM

M :	Plaies de membres non bandés
MB :	Plaies de membres bandés
MCP :	Monocyte chemoattractant protein
MEC :	Matrice extracellulaire
mg :	Milligramme
min :	Minute
mJ :	Millijoule
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre
mM :	Millimolaire
MMP :	Métalloprotéinases matricielles
MMP-1 :	Interstitial collagenase
MMP-2 :	Gelatinase A
MMP-3 :	Stromelysin 1
MMP-7 :	Matrilysin
MMP-13 :	Collagenase 3
mol/L :	Molaire
N :	Normale
ng :	Nanogramme
NIH :	National Institute of Health
nm :	Nanomètre
ON :	Ostéonectine
ORF :	Open reading frame
p :	Valeur de probabilité
pb :	Paires de bases
PCR :	Réaction en chaîne de polymérase
PDGF :	Platelet-derived growth factor
PDGFRB :	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PECAM1 :	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PG :	Protéoglycane
PMC :	Protéine matricielle

PMN :	Cellules polymorphonucléaires
PN :	Peau normale
PRRX2 :	Paired related homeobox 2
PRRX2 ^{-/-} :	Souris invalidées pour "paired related homeobox 2"
PRRX2 ^{+/+} :	Souris de type sauvage pour "paired related homeobox 2"
Rf :	Déplacement sur le gel
RFLP :	Polymorphismes de la longueur du fragment de restriction
RGD :	Séquence d'arginine, de glycine et d'acide aspartique
RNase :	Ribonucléase
RSB :	Research Services Branch
RT-PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
sec :	Seconde
S-Gal :	3,4-cyclohexenoesculetin- β -D-galactopyranoside
SLRP :	Petits protéoglycanes interstitiels riches en leucine
SPARC :	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine
SPARC ^{-/-} :	Animaux invalidées pour SPARC
SOCS1 :	Suppressor of cytokine signaling 1
SSH :	Hybridation soustractive suppressive
T :	Plaies thoraciques
TGFB :	Transforming growth factor, beta
TGFB1 :	Transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
TGFB2 :	Transforming growth factor, beta 2
THBS :	Thrombospondin
THBS1 :	Thrombospondin 1
THBS2 :	Thrombospondin 2
THBS2 ^{-/-} :	Souris invalidées pour "Thrombospondin 2"
THBS3 :	Thrombospondin 3
THBS4 :	Thrombospondin 4
TIMP :	Tissue inhibitors of metalloproteinases

TIMP1 :	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
TNF :	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
U :	Unité enzymatique
UV :	Ultra-violet
V :	Volt
VCAM :	Vascular cell adhesion molecule
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VLA-4 :	Very late antigen-4
VWF :	von Willebrand factor

Liste des tableaux

	Page
Tableau I Les facteurs de croissance dans la guérison cutanée.	19
Tableau II Liste d'amorces de la trousse "SMART PCR cDNA synthesis".	55
Tableau III Liste d'amorces sens (-A) et antisens (-1) utilisés pour le séquençage, la validation et l'analyse de l'expression temporelle de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH), de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC), de lumican (LUM) et de "thrombospondin 2" (THBS2).	60
Tableau IV Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de "thrombospondin 2" (THBS2) équin avec celle des autres espèces.	67
Tableau V Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin avec les séquences d'autres espèces.	69
Tableau VI Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de lumican (LUM) équin avec les séquences d'autres espèces.	71

Liste des figures

		Page
Figure 1	Structure de "thrombospondin" (THBS).	47
Figure 2	Structure de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC).	47
Figure 3	Structure de lumican (LUM).	48
Figure 4	Schéma résumant les étapes de la méthodologie.	53
Figure 5	Séquences en acides nucléiques et aminés de "thrombospondin 2" (THBS2) équin.	65
Figure 6	Séquences en acides nucléiques et aminés de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin.	68
Figure 7	Séquences en acides nucléiques et aminés de lumican (LUM) équin.	70
Figure 8	Analyse de l'expression en ARNm de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) équin.	74
Figure 9	Analyse de l'expression en ARNm de "thrombospondin 2" (THBS2) équin.	75
Figure 10	Analyse de l'expression en ARNm de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin.	76
Figure 11	Analyse de l'expression en ARNm de lumican (LUM) équin.	77

Remerciements

Nous aimerions remercier le "Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada" (CRSNG) ainsi que le "Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies" pour les fonds qui ont été fournis. Aussi, des remerciements sont de mises envers Dre Christine L. Theoret pour l'opportunité d'avoir travaillé dans son laboratoire et pour ses connaissances sur la guérison cutanée. De plus, j'aimerais faire de même pour Dr Jacques G. Lussier, Josiane Lefebvre-Lavoie, Zoë Ipiña, Vincenzo Miragliotta, Manon Salvas, Isabelle Daneau, Stéphanie Bolduc, Aaron Cory et Valérie Dubuc pour leur assistance technique.

Sur une note personnelle, j'aimerais remercier ma conjointe, mes parents et mes amis pour leur support et leurs encouragements qu'ils me donnent depuis plusieurs années. Vous êtes en partie responsable de mes réalisations et j'aimerais sincèrement vous dire : merci.

Introduction

La guérison de plaie chez les chevaux est un processus problématique qui génère d'importants coûts pour l'industrie équine, par l'entremise des traitements souvent prolongés ainsi que du retrait de la compétition des animaux affectés. Les problèmes de guérison se situent principalement aux membres, qui en réponse à une injure, ont tendance à souffrir de nombreuses complications comme la surproduction de tissu de granulation et un retard de la contraction ainsi que de l'épithélialisation. Ces difficultés représentent un obstacle à la fermeture de plaie, favorisent la formation tardive d'un nouvel épithélium fragile et susceptible à une nouvelle blessure. Cette étude a pour objectif ponctuel de contribuer à une meilleure compréhension de la guérison normale et pathologique chez le cheval afin d'innover les thérapies anti-cicatricielles existantes.

Il existe très peu d'information sur la fibroplasie excessive et le problème de chronicité qui affligent les plaies équines. Il est tentant de spéculer que le succès mitigé remarqué lors du traitement de ces complications pourrait résulter d'un manque de compréhension du contrôle génique de la guérison chez le cheval, surtout en ce qui a trait à la phase proliférative.

L'étude de Lefebvre-Lavoie et coll. (2005) a permis d'identifier les gènes sur-exprimés au cours de cette phase proliférative en comparant des échantillons provenant de plaies thoraciques âgées de sept jours à des échantillons de peau normale, non-lésée, chez le cheval. Dans la présente étude, nous avons ciblé trois de ces gènes, soit "thrombospondin-2" (THBS2), "secreted protein, acidic and rich in cysteine" (SPARC) et lumican (LUM), en raison de leur présumé rôle durant le processus de remodelage. Ainsi, nous avons caractérisé l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) de ces gènes de façon à analyser, par la suite, leur expression temporelle durant la guérison cutanée normale et problématique, chez le cheval, sur une période de six semaines.

1 Récension de la littérature

1.1 Physiologie de la guérison cutanée normale

Une barrière physique, dont l'élément principal est la peau, est le premier plan de défense contre l'invasion par des substances de l'environnement externe. Lorsque cet organe complexe est endommagé, sa guérison permet de rétablir rapidement une barrière à fonction protectrice (Tizard, 2000). Toutefois, alors qu'au plan de l'épiderme les cellules perdues seront remplacées par des cellules de nature identique grâce au phénomène de régénération, le derme sous-jacent doit se réparer afin de rétablir la continuité tissulaire, et ce, par un tissu cicatriciel (Theoret, 2001b). Lors de circonstances normales, la guérison de plaies cutanées s'effectue en trois phases se chevauchant dans le temps: la phase inflammatoire, proliférative et de remodelage (Singer et Clark, 1999).

1.1.1 Phase inflammatoire

L'inflammation qui s'exécute suite au trauma est constituée d'une réponse cellulaire et vasculaire qui ont pour but principal de nettoyer la plaie afin que se poursuive la guérison (Theoret, 2001a). Ce processus implique, entre autres, trois types cellulaires importants : les plaquettes, les neutrophiles et les monocytes/macrophages (Clark, 1996).

1.1.1.1 Les plaquettes

La principale fonction des plaquettes est d'assurer l'homéostasie en formant et en consolidant un caillot de fibrine et de cellules qui obture temporairement l'ouverture présente dans le vaisseau sanguin (De Martin et Theoret, 2002). Lorsqu'elles sont activées, les plaquettes relâchent des médiateurs inflammatoires qui modulent le tonus et la perméabilité vasculaire, attirent des cellules inflammatoires, et provoquent la mitogenèse des cellules mésenchymateuses (Clark, 1996).

Initialement, les plaquettes sont activées en s'adhérant aux éléments de la membrane sous-endothéliale. Le plus souvent, la glycoprotéine Ib des plaquettes interagit avec le collagène de la membrane basale des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire du "von Willebrand factor" (VWF). Cette activité mène au relâchement de nombreuses protéines possédant diverses fonctions régissant la guérison (Tableau I). La fibronectine, le fibrinogène et "thrombospondin" (THBS) agissent comme ligands induisant l'agrégation plaquettaire. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine; ce dernier stabilise le thrombus en se polymérisant, ce qui amplifie l'activation et l'agrégation plaquettaires. Ces étapes permettent la formation d'un caillot riche en fibrine qui agira comme bouchon pour le rétablissement de l'hémostase ainsi que de la matrice extracellulaire (MEC) provisoire pour la migration des cellules inflammatoires puis mésenchymateuses dans les phases subséquentes de la guérison (Clark, 1996). De plus, le caillot est un réservoir important de cytokines, messagers intercellulaires causant la migration, la prolifération et/ou la synthèse protéique par divers types cellulaires.

Tableau I Les facteurs de croissance dans la guérison cutanée.
Tiré du Tableau III dans le premier chapitre de Clark (1996)

Facteur de croissance	Rôle(s)
Fibroblast growth factor -1 et -2	Prolifération des fibroblastes et des cellules épidermiques; angiogénèse
Insulinlike growth factor	Facteur de la progression de la prolifération cellulaire
Platelet-derived growth factor	Chimiotaxisme, prolifération et contraction des fibroblastes
Vascular endothelial growth factor	Perméabilité vasculaire; angiogénèse

1.1.1.2 Les neutrophiles

Le neutrophile a comme principale fonction la destruction bactérienne via la phagocytose et des mécanismes enzymatiques, assurant ainsi un environnement favorable à la guérison (De Martin et Theoret, 2002). Le neutrophile est également une source importante de cytokines pro-inflammatoires comme "interleukin 1" (IL1), "tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)" (TNF) et "transforming

growth factor, beta" (TGFB). Cependant, les neutrophiles ne semblent pas essentiels à la réparation de plaies non-contaminées (Clark, 1996).

Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires à peupler les tissus endommagés, dû principalement à leur grand nombre dans la circulation. Les neutrophiles réussissent à y parvenir grâce à des chémoattractants induisant leur migration (roulement) vers une région traumatisée. Ces chémoattractants augmentent l'expression d'intégrines à la surface du neutrophile, permettant l'activation puis l'adhérence à la membrane endothéliale et facilitant la transmigration des leucocytes à travers cette paroi (Clark, 1996). Par la suite, les neutrophiles activés relâchent de l'élastase et de la collagénase qui facilitent leur pénétration à travers la membrane basale des vaisseaux sanguins. Une fois arrivés au site de trauma, les neutrophiles éliminent les bactéries via la phagocytose, la digestion enzymatique et la réaction avec des radicaux libres d'oxygène. Lorsque la plaie n'est plus contaminée, l'infiltration de neutrophiles cesse alors que les neutrophiles déjà sur place deviennent inactifs et sont emprisonnés dans le caillot. Lors d'infection importante, l'inflammation peut perdurer au site de la plaie, menant à plusieurs types de problèmes de guérison (Clark, 1996).

1.1.1.3 Les macrophages

L'attraction des monocytes au site de lésion se fait par des chémoattractants spécifiques tels les "monocyte chemoattractant protein" (MCP)-1, -2 et -3 ainsi que par diverses cytokines et des fragments de protéines telle le collagène, l'élastine, la fibronectine et la thrombine. Ces chémoattractants facilitent la migration des monocytes depuis la circulation sanguine jusqu'au stroma tissulaire (Clark, 1996), où la cellule devient mature et se nomme dorénavant "macrophage" (Tizard, 2000). Les intégrines à la surface du monocyte/macrophage lient des protéines spécifiques de la MEC, induisant leur phagocytose, parfois favorisée par les opsonines comme C_{3b} et le fragment Fc des anticorps. De plus, lorsque les monocytes adhèrent à la MEC, ils se métamorphosent en macrophages réparateurs, qui se chargeront d'orchestrer les phases subséquentes de la réparation (Clark, 1996).

Les macrophages se retrouvant dans la plaie relâchent des enzymes, tels la collagénase, qui facilitent le débridement tissulaire. L'adhérence des macrophages à la MEC provoque l'expression d'acide ribonucléique messager (ARNm) de "colony-stimulating factor-1" (CSF-1), de TNF, de "platelet-derived growth factor" (PDGF), de "jun oncogene" (JUN) et de "v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog" (FOS). CSF-1 est une cytokine clé pour la survie des monocytes et des macrophages. Le TNF est une cytokine inflammatoire puissante, tandis que JUN et FOS sont des facteurs nécessaires à l'activation du macrophage (Clark, 1996). Par ailleurs, l'ARNm de TGFB est constitutivement exprimé par le monocyte, celui de IL1 est exprimé suite à la stimulation par l'endotoxine bactérienne et celui de "human leukocyte antigen-D-related" (HLA-DR) est exprimé suite à la stimulation par "interferon, gamma" (IFNG). Toutes ces cytokines synthétisées par les macrophages de la plaie gouvernent la genèse de nouveaux tissus. Alors, les animaux présentant un faible nombre de macrophages peuvent souffrir d'une guérison défectueuse (Clark, 1996).

Autrement dit, les monocytes et les macrophages sont essentiels pour le nettoyage de la plaie. Une fois ce débridement terminé, ils sécréteront des médiateurs qui permettront la transition de la phase inflammatoire à la phase proliférative de la guérison.

1.1.2 Phase proliférative

La phase proliférative a pour but de remplacer la matrice lésée (Clark, 1996). Ceci est possible grâce aux processus d'épithélialisation, de fibroplasie, d'angiogénèse et de contraction (Theoret, 2001a).

1.1.2.1 Épithélialisation

L'épithélialisation débute dans les heures suivant l'injure. Les cellules migratoires proviennent de l'épithélium résiduel situé en périphérie de la plaie ou des annexes cutanées situées à la base de la plaie (Theoret, 2001a). Elles doivent changer leur phénotype afin de minimiser les connexions physiques avec d'autres cellules (desmosomes) et la membrane basale (hémidesmosomes) permettant ainsi le

déplacement cellulaire. Les cellules épithéliales migrent sous le caillot, grâce à une activité phagocytaire et enzymatique, le détachant ainsi du nouveau tissu de granulation sous-jacent.

L'initiation de la migration ne dépend pas de la prolifération cellulaire, cependant, quarante à soixante-douze heures après le trauma, les cellules de l'épithélium intact en bordure de plaie se mettent à proliférer dans le but de remplacer les cellules ayant migré, permettant ainsi la poursuite de l'épithélialisation.

La migration cesse, par inhibition de contact, lorsque les cellules épithéliales se rencontrent au centre de la plaie. Elles retrouvent par la suite leur phénotype de départ, puis, lentement, le nouvel épiderme se re-stratifie et rétablit des liens avec la membrane basale. La latence de ce dernier processus explique, en partie, la fragilité d'une plaie nouvellement épithélialisée.

1.1.2.2 Fibroplasie

La fibroplasie représente le processus de synthèse de composants de la MEC (Theoret, 2001a). Les cellules responsables de la reconstitution de ce tissu conjonctif sont les fibroblastes, d'où le nom "fibroplasie" (Postlethwaite et Kang, 1999). Les macrophages, les fibroblastes et les vaisseaux sanguins migrent ensembles dans la plaie. Les macrophages procurent une source de cytokines dont l'action encourage la fibroplasie et l'angiogénèse, les fibroblastes élaborent la nouvelle MEC nécessaire au soutien de la croissance cellulaire, alors que les vaisseaux sanguins transportent les nutriments et l'oxygène requis pour le métabolisme cellulaire.

Les fibroblastes migrent dans la plaie depuis le derme environnant, grâce aux chémoattractants sécrétés par les cellules inflammatoires déjà sur place. Les principales cytokines encourageant la migration du fibroblaste sont PDGF, "basic fibroblast growth factor" (FGF2) et TGF β . Une fois dans la plaie, les fibroblastes prolifèrent puis sécrètent plusieurs constituants provisoires de la MEC, surtout de la fibronectine, de l'hyaluronane et du collagène immature (de type III) qui serviront de charpente sur laquelle d'autres fibroblastes pourront se déplacer. Ce tissu rosé et

d'apparence granulaire en raison du nombre important de capillaires qui s'y trouvent, est visible au fond d'une plaie environ une semaine suivant sa création.

Une fois cette synthèse accomplie, certains fibroblastes disparaîtront par apoptose alors que d'autres changeront à nouveau de phénotype pour devenir des myofibroblastes (Desmoulière et *al.*, 1995; Clark, 1996).

1.1.2.3 Angiogénèse

L'angiogénèse représente la formation de nouveaux vaisseaux lors de l'embryogénèse, de la formation d'une tumeur ou en réponse à une blessure, par les cellules endothéliales micro-vasculaires (Madri et *al.*, 1996). La destruction tissulaire ainsi que l'hypoxie amènent le largage de médiateurs angiogéniques spécifiques tels FGF2 et "vascular endothelial growth factor" (VEGF) durant la phase inflammatoire. TGFB, "epidermal growth factor" (EGF), PDGF participent indirectement à l'angiogénèse en augmentant la production de FGF2 et de VEGF par les macrophages et les cellules endothéliales (Sato et *al.*, 1993).

Le processus d'angiogénèse comprend le bris de la liaison entre les cellules endothéliales et leur membrane basale, la migration et la prolifération des cellules dans le stroma local, la formation et la stabilisation de nouveaux micro-vaisseaux et, finalement, la régression du lit vasculaire nouvellement formé, sans que les vaisseaux originaux ne soient affectés (De Martin et Theoret, 2002).

Les cytokines citées plus haut favorisent la sécrétion, par les cellules endothéliales migrantes, de protéinases requises pour la digestion de la membrane basale. Elles induisent de plus l'expression de "vascular cell adhesion molecule" (VCAM) à la surface des cellules endothéliales. L'interaction de VCAM avec "very late antigen-4" (VLA-4) des monocytes et des lymphocytes amène la protéolyse de la membrane basale (Madri et *al.*, 1996). Les cellules ainsi libérées savent migrer de façon à former des nouveaux micro-vaisseaux, grâce aux intégrines de surface qui gouvernent leur attache aux composantes de la MEC (Tonnesen et *al.*, 2000). Les cellules qui demeurent dans le vaisseau original commencent à proliférer, assurant ainsi une source continue de cellules pour l'angiogénèse. La prolifération des cellules endothéliales varie suivant la composition et l'organisation de la MEC ainsi

que selon la présence de certains médiateurs. De plus, la prolifération est influencée par le phénotype cellulaire puisque ce dernier diffère entre les cellules situées près du vaisseau parent et celles situées près du site migratoire (Madri *et al.*, 1996).

La tubulogénèse, mécanisme par lequel un nouveau micro-vaisseau acquiert une lumière, dépend de "platelet/endothelial cell adhesion molecule" (PECAM1) qui permet d'établir le contact initial entre cellules endothéliales. La protéolyse induite par FGF2 assure la création d'une lumière alors que l'anti-protéolyse, nécessaire au contrôle du diamètre de la lumière, est gouvernée par TGFB (Pepper et Montesano, 1990). Par la suite, l'organisation des récepteurs de surface de type intégrine $\beta 1$, dans la région du contact cellule-cellule, permet la stabilisation des nouveaux vaisseaux ainsi que la formation de jonctions serrées (Madri *et al.*, 1996).

L'angiogénèse se termine lorsque le tissu de granulation comblant la plaie se remodèle et que son besoin en oxygène est amoindri. En présence de tissu cicatriciel riche en collagène mature (de types I et IV), les micro-vaisseaux subissent une involution suite à l'apoptose des cellules endothéliales (Singer et Clark, 1999; Ilan *et al.*, 1998). Cette mort cellulaire programmée est probablement contrôlée, notamment, par "thrombospondin 1" (THBS1) et THBS2. (Boerma *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 1999)

1.1.2.4 Contraction

Un rapprochement des bords de plaie se produit durant la deuxième semaine de la guérison par un phénomène de contraction qui implique des interactions importantes entre les cellules, la MEC et des cytokines. Le myofibroblaste, un phénotype particulier du fibroblaste, est une cellule à activité contractile surtout en raison de la présence de la protéine " α -smooth muscle actin" (α -SMA) (Postlethwaite et Kang, 1999), et à laquelle on attribue le rôle de contraction de plaie (Gabbiani *et al.*, 1972).

La contraction talonne la synthèse et le dépôt des fibrilles de collagènes par les fibroblastes de phénotype synthétique. Grâce à leurs microfilaments riches en α -SMA, les myofibroblastes, alignés selon les forces de tension dans la plaie, peuvent établir des liens cellule-cellule et cellule-MEC de façon à réduire la surface de la

plaie (Clark, 1996). La contraction générée par le myofibroblaste dépend des liens entre le collagène matriciel et les intégrines présentes à la surface des myofibroblastes, des liens entre les amas de collagène matriciel ainsi que de l'action de PDGF et de "transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)" (TGFB1) ou de "transforming growth factor, beta 2" (TGFB2) (Singer et Clark, 1999).

En plus d'accélérer la guérison, la contraction améliore l'apparence cosmétique et la force de la cicatrice, puisqu'elle diminue la surface de la plaie devant être recouverte d'un nouvel épithélium fragile et dénué d'annexes cutanées (Jacobs et *al.*, 1984). Chez le cheval, un degré de contraction élevé est souhaité lors de la guérison, contrairement à l'homme, où il peut entraîner la formation de contractures et de cicatrices inesthétiques.

La contraction se termine soit lorsque la plaie est complètement épithélialisée ou lorsque les forces tensiles environnantes excèdent la force contractile du myofibroblaste. Le myofibroblaste disparaît de la cicatrice en retrouvant un phénotype quiescent ou par apoptose (Desmoulière et *al.*, 1995).

1.1.3 Phase de remodelage

Le remodelage de la plaie consiste en la transition du tissu de granulation à un tissu cicatriciel mature. La matrice déposée préalablement lors de la fibroplasie (riche en collagène de type III, en fibronectine et en hyaluronane) est remplacée par une matrice composée de collagène de type I et de protéoglycanes (PG). La dégradation des constituants provisoires de la MEC se produit grâce à l'action de protéinases générées durant la phase proliférative. Ces protéinases sont activées par le système activateur du plasminogène-plasmine ainsi que par son produit, la plasmine. Les principales protéinases ayant comme substrat le collagène, sont "interstitial collagenase" (MMP-1), "gelatinase A" (MMP-2) et "stromelysin 1" (MMP-3), toutes membres de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). Les inhibiteurs spécifiques des MMP sont les "tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMP). Le ratio entre les MMP et les TIMP est important lors du remodelage et varie grâce à l'action de TGFB, de PDGF et de IL1 (Clark, 1996).

Trois semaines suivant une injure, la plaie n'a retrouvé que 20% de sa force tensile initiale. Par la suite, le dépôt de collagène s'effectue plus lentement ce qui ralentira l'accroissement de la force de la plaie. Le remodelage du collagène avec l'augmentation du diamètre des fibres ainsi que leur compaction et leur polymérisation, puis la modification des liens entre les composants de la MEC sont des processus lents, ce qui contribue au regain tardif de la force tensile. Finalement, la peau ne retrouvera jamais toute sa force tensile originelle. En effet, dans les meilleures circonstances, une cicatrice récupère seulement 70-80% de sa force tensile initiale (Clark, 1996).

1.2 Guérison cutanée chez le cheval

La guérison de plaie doit souvent se faire par seconde intention chez le cheval puisque la contamination, la tension de la peau environnante, ainsi que la perte de tissus sont importantes et ces éléments entravent la fermeture primaire (par suture). À cet effet, une étude rétrospective rapporte que sur 422 plaies suturées, seulement 24% ont atteint une fermeture complète sans déhiscence (Wilmink et *al.*, 2002). De nombreuses difficultés affligent ce mode de guérison chez le cheval, compromettant ainsi les résultats cosmétique et fonctionnel de la réparation. Une guérison défectueuse et la cicatrisation excessive qui en résulte représentent un lourd fardeau économique pour l'industrie équine. Il a récemment été rapporté que 7% des traumatismes causant un arrêt permanent de la compétition chez les chevaux de course sont le résultat d'une blessure cutanée (Perkins et *al.*, 2005).

Parmi les obstacles à une guérison rapide et de qualité, certains sont notés préférentiellement dans les plaies situées à la portion distale du membre. Le prolongement de la phase inflammatoire, la fibroplasie accrue, les retards d'épithélialisation et de contraction, ainsi qu'un remodelage défectueux de la MEC en sont des exemples.

Spécifiquement, la réponse inflammatoire chez le cheval fait preuve d'une intensité déficiente alors que sa résolution est retardée par rapport à celle du poney (Wilmink et *al.*, 1999b; Wilmink et *al.*, 2003), favorisant la formation d'un tissu de granulation malsain. Ceci est analogue à ce qui est observé dans de nombreuses

maladies caractérisées par une cicatrisation démesurée (cirrhose hépatique; glomérulonéphrite; fibrose pulmonaire; chéloïde). L'insuffisance de la réponse inflammatoire dans les membres du cheval peut être liée à la pauvre vascularisation tissulaire de cette région anatomique, qui limite l'influx de leucocytes, et/ou à la faible sécrétion de médiateurs inflammatoires par les cellules polymorphonucléaires (PMN) des chevaux comparativement à celle des PMN de poneys (Wilmink et *al.*, 2003). En effet, les PMN de poney relâchent plus de radicaux libres d'oxygène nécessaires à la lyse bactérienne et produisent de plus grandes concentrations de cytokines telles TNF, IL1 et TGFB (van den Boom et *al.*, 2002; Wilmink et *al.*, 2003), qui renforcent la réponse inflammatoire, favorisant ainsi la résolution de l'inflammation, une transition rapide et harmonieuse vers les phases subséquentes de la guérison. Ces différences entre le cheval et le poney s'apparentent à celles remarquées chez l'homme, pour qui la formation du chéloïde serait liée à la prédisposition génétique des personnes aux origines africaines (Thomas et *al.*, 1994; Tuan et Nichter, 1998; Tredget et *al.*, 1997). Notamment, une faible concentration de TNF, ainsi que "interferon, alpha" (IFNA) et IFNG a été mesurée aux monocytes de patients souffrant de chéloïde (McCauley et *al.*, 1992).

La fibroplasie qui survient lors de la phase proliférative de guérison chez le cheval peut être excessive et mener à la formation d'un tissu de granulation exubérant, condition appelée "bouton de chair" chez l'espèce équine. En effet, la synthèse collagénique est rapide et étendue chez le cheval en comparaison aux autres espèces (Chvapil et *al.*, 1979), en particulier dans les plaies appendiculaires (Jacobs et *al.*, 1984). À cet effet, l'activité mitotique du fibroblaste en provenance de la croupe s'atténue normalement à la fin de la première semaine de guérison alors que celle du fibroblaste appendiculaire demeure élevée au-delà de cette période (Wilmink et *al.*, 1999b). Cette prolifération fibroblastique soutenue dans le membre pourrait expliquer, en partie, le développement du bouton de chair puisque la synthèse de tissu de granulation se fait par le fibroblaste dermique. Ce phénomène pourrait être exacerbé par la présence continue des fibroblastes à caractère synthétique en raison d'une baisse de l'apoptose tel que rencontré chez l'homme atteint de chéloïde (Ladin et *al.*, 1998). Cette hypothèse a récemment été soutenue

par une étude démontrant un processus apoptotique modifié dans les plaies de membres par rapport aux plaies thoraciques chez le cheval (Lepault et *al.*, 2005).

Par ailleurs, le profil cytokinique des plaies appendiculaires est altéré en faveur de médiateurs pro-fibrotiques, notamment TGFB (Cochrane, 1997; Theoret et *al.*, 2001; Schwartz et *al.*, 2002; van den Boom et *al.*, 2002). Ces médiateurs encouragent la migration et la prolifération des fibroblastes ainsi que leur synthèse de collagène, en plus d'inhiber le remodelage de la MEC via la régulation négative des MMP et la régulation positive des TIMP.

Le tissu de granulation est caractérisé par un grand nombre de micro-vaisseaux. Une récente étude a mis à l'évidence l'occlusion de la lumière des vaisseaux en provenance de plaies de membres (Lepault et *al.*, 2005). Cette occlusion, possiblement causée par l'hypertrophie des cellules endothéliales micro-vasculaires (Dubuc et *al.*, 2006), pourrait entraîner de l'hypoxie tissulaire. Or, l'hypoxie peut stimuler la synthèse de TGFB1 (Hakkinen et *al.*, 1996) et augmenter le nombre de récepteurs pour TGFB à la surface des fibroblastes (Falanga et *al.*, 2002). Ces deux événements entraîneraient une augmentation de la production de collagène par les fibroblastes.

Les plaies situées sur les membres souffrent d'une plus faible vitesse d'épithélialisation (Jacobs et *al.*, 1984), souvent en raison de la présence d'un bouton de chair. Ce tissu de granulation exubérant constitue une barrière physique à la migration des cellules épithéliales (Wilmink et *al.*, 1999a) en plus d'inhiber l'activité mitotique de ces dernières (Shakespeare et Shakespeare, 1991). Par la suite, l'absence d'une couverture épithéliale favorise la synthèse de cytokines pro-fibrotiques (tel que TGFB) (LePoole et Boyce, 1999) et affaiblit le processus apoptotique (Greenhalgh, 1998), perpétuant ainsi la fibroplasie excessive.

Le processus de contraction contribue de façon importante à une fermeture de plaie rapide, solide et cosmétique chez l'espèce équine. Cependant, les plaies des membres contractent moins et plus lentement que celles situées sur le tronc (Walton et Neal, 1972; Wilmink et *al.*, 1999a; Theoret et *al.*, 2001). Ce retard n'a pu être attribué à une différence dans les capacités contractiles inhérentes aux myofibroblastes (Wilmink et *al.*, 2001), impliquant que des facteurs

environnementaux, comme le profil de cytokines lors de la réponse inflammatoire, définissent l'étendue de la contraction. Dans le cas d'une plaie ayant développé un bouton de chair, le tissu de granulation exubérant retarde ou empêche la guérison en nuisant à la contraction. Ceci pourrait résulter d'un arrangement chaotique des myofibroblastes dans les plaies appendiculaires (Wilmink et al., 1999b; Schwartz et al., 2002) puisque c'est le degré d'organisation plutôt que le nombre de myofibroblastes qui détermine la vitesse et l'étendue de la contraction. Finalement, un facteur pouvant coupler la piètre qualité de contraction à la fibroplasie excessive survenant aux plaies appendiculaires, est la tension marquée de la peau à cet endroit. En effet, la peau du membre chez le cheval est fortement fixée, ce qui pourrait limiter la capacité contractile d'une plaie à cet endroit et causer une augmentation de la tension cutanée locale en l'occurrence de contraction. Chez l'homme, il a été démontré qu'une cessation du stress mécanique est nécessaire à la transition du tissu de granulation vers un tissu cicatriciel (Grinnell et al., 1999). Il existe de plus une relation entre la tension cutanée et la synthèse exagérée/lyse inadéquate de la MEC, possiblement liée à la sur-expression de cytokines pro-fibrotiques. Vu l'influence de TGFB sur la prolifération et la synthèse collagénique par le fibroblaste (Sporn et Roberts, 1991) ainsi que son effet anti-apoptotique sur ces cellules (Chodon et al., 2000; Jelaska et Korn, 2000), cette cytokine pourrait représenter le lien moléculaire entre la piètre contraction et le développement du bouton de chair dans les plaies appendiculaires chez le cheval.

Un équilibre entre l'activité des MMP et celle de leurs inhibiteurs, les TIMP, est critique au remodelage, et ainsi à la maturation, du tissu cicatriciel. Dans le cas d'une abondance de protéinases, une lyse accrue de la MEC pourrait mener au développement d'une plaie indolente (Cochrane, 1997) alors que la situation inverse favoriserait la synthèse collagénique et le développement d'un bouton de chair. Une forte teneur en ARNm pour "TIMP metallopeptidase inhibitor 1" (TIMP1) fut récemment détectée une et quatre semaines suivant la création de plaies appendiculaires chez le cheval, par rapport à la concentration présente dans les plaies thoraciques (Schwartz et al., 2002). Puisque TIMP1 inhibe la lyse du

collagène, sa présence soutenue à quatre semaines aux membres pourrait expliquer l'accumulation excessive de MEC qui afflige fréquemment les plaies à cet endroit.

1.3 Contrôle génique de la guérison

La guérison cutanée est un processus fort complexe, qui dépend d'interactions entre divers types cellulaires, de nombreux médiateurs et d'éléments de la MEC qui agissent localement, en parallèle avec une multitude de facteurs systémiques (Soo et *al.*, 2002). La transition entre les phases de guérison exige une régulation serrée de l'expression génique, à la hausse ou à la baisse (Cole et *al.*, 2001). En soit, la modulation de l'expression de certains gènes pourrait conduire à la cicatrisation anormale, tel que rapporté chez l'homme et le rongeur (Russell et *al.*, 1989; Sayah et *al.*, 1999; Tsou et *al.*, 2000).

Le profil génique de l'homme suite à une blessure cutanée a récemment déterminé, à l'aide de micro-réseaux d'ADNc (Cole et *al.*, 2001). L'intensité d'expression de 3% des gènes à l'étude a doublé une demi-heure suite au trauma cutané, alors qu'aucun gène n'a démontré une baisse d'expression. Cependant, trente minutes plus tard, 6,6% des gènes (principalement à rôle structural) ont diminué de moitié leur expression. Parmi les gènes fortement exprimés en période aiguë, "suppressor of cytokine signaling 1" (SOCS1), "basogranulin" (BB1) et le précurseur de "low density lipoprotein receptor" (LDLR) ont été identifiés. La forte expression de ces gènes en période aiguë, illustre le processus d'initiation de l'inflammation de la guérison cutanée (Cole et *al.*, 2001).

Soo et coll. (2002) ont utilisé la technique d'affichage différentiel de la réaction de polymérisation en chaîne (DD-PCR) pour analyser la modulation de l'expression génique durant la guérison cutanée chez le rat. En comparant les échantillons provenant de plaies à ceux de peau normale, ils ont obtenu 35 fragments d'ADNc dont l'expression était modifiée. Parmi les gènes sur-exprimés, ils ont identifié "interleukin 1, beta" (IL1B), qui induirait la production de "fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)" (FGF7) par les fibroblastes (Chedid et *al.*, 1994). Chez la souris, ce facteur de croissance jouerait un rôle important durant

l'épithélialisation et serait sur-exprimé une semaine après la création d'une plaie cutanée (Werner *et al.*, 1992; Werner *et al.*, 1994).

Grâce au micro-réseaux d'ADNc, une étude a été effectuée sur la peau de rats foetaux dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires régissant la guérison par régénération (Chen *et al.*, 2006); 0,46 et 0,47% des gènes étudiés étaient respectivement sur-exprimés et sous-exprimés dans la peau du fœtus qui guérit sans cicatrice. Parmi les gènes sur-exprimés, le FGF2 et la follistatine furent identifiés. Il est intéressant de noter que les souris sous-exprimant FGF2 souffrent de difficulté de guérison de plaies excisionnelles, probablement en raison du rôle capital de FGF2 dans l'angiogénèse (Ortega *et al.*, 1998; Pierce *et al.*, 1992).

Une analyse de l'expression des gènes "Homeobox" a été effectuée grâce à la technique de la réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR) sur des cultures de fibroblastes ainsi que des échantillons de peau normale et de plaies humaines de façon à identifier les gènes responsable de la régénération tissulaire foetale (Stelnicki *et al.*, 1998). En comparant l'expression génique durant la guérison foetale par rapport à celle chez l'adulte, les chercheurs ont identifié deux nouveaux gènes : "paired related homeobox 2" (PRRX2) et "homeobox B13" (HOXB13). L'évaluation de la guérison de plaie a par la suite été effectuée sur des souris HOXB13 "knockout (KO)" adultes (Mack *et al.*, 2003), montrant que l'absence d'expression de HOXB13 induit la guérison de type foetal (sans cicatrice) chez l'adulte. Les souris HOXB13 KO démontraient de plus petites plaies une semaine suivant la blessure, une meilleure organisation du collagène et une meilleure force, alors que les plaies excisionnelles guérissaient plus rapidement et contenaient plus d'hyaluronane que celle de souris sauvages. Des fibroblastes provenant de peau de souris invalidés pour "paired related homeobox 2" (PRRX2^{-/-}) et de type sauvages (PRRX2^{+/+}) ont été analysés (White *et al.*, 2003). Les fibroblastes PRRX2^{+/+} ont démontré une prolifération accrue, une meilleure ré-organisation de la MEC et une forte production de MMP-2 et d'hyaluronane par rapport aux fibroblastes PRRX2^{-/-}. Ces investigateurs attribuent donc l'induction de la guérison de type foetal à la présence de PRRX2.

Les micro-réseaux d'ADNc ont été utilisés pour mieux comprendre l'altération génique lors de la cicatrisation et la contraction de plaie (Wu et *al.*, 2004). Quatre-vingt-quatorze des 4096 gènes à l'étude étaient sur-exprimés alors que trois étaient sous-exprimés dans des cicatrices hypertrophiques résultant de brûlures chez l'homme. Les gènes sur-exprimés seraient proto-oncogènes, apoptotiques, immunitaires, des éléments du cytosquelette, etc. La sur-expression d'éléments cytosquelettiques amplifierait la puissance des tissus nouvellement formés, expliquant la contraction accrue affligeant les cicatrices hypertrophiques. D'autre part, la sur-expression de gènes immunitaires, principalement ceux induits par "interferon" (IFN), signalerait une intention anti-fibrogénique du système dans le but de contrôler la croissance cellulaire exagérée.

L'analyse des molécules participant à la guérison est nécessaire pour élucider les difficultés dont souffrent les chevaux. À cet effet, l'identification de gènes sur-exprimés durant la phase proliférative de la guérison cutanée a été réalisée chez le cheval (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005). À l'aide de l'hybridation soustractive suppressive (SSH), ce groupe a défini l'expression génique durant la guérison normale en comparant des échantillons de bord de plaie une semaine après leur création au thorax à ceux provenant de peau normale. Lefebvre-Lavoie et coll. (2005) ont ainsi identifié 226 ADNc non-redondants dont 69% n'ayant aucun rôle préalablement attribué à la guérison, chez aucune espèce. Ces gènes seraient possiblement responsables de différents aspects de la guérison et pourraient être exprimés différemment dans les plaies de membres comparativement à celles du thorax; chez les chevaux par rapport aux poneys; ou aux plaies en état d'inflammation chronique ou développant du tissu de granulation exubérant comparativement aux plaies guérissant normalement. Parmi les gènes identifiés par Lefebvre-Lavoie et coll. (2005), neuf sont présentement à l'étude, dont trois dans ce travail de maîtrise.

1.4 Les gènes à l'étude : THBS2, SPARC et LUM

Les gènes à l'étude ont été sélectionnés parmi ceux démontrant une sur-expression lors de la guérison cutanée chez le cheval (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005) pour leur présumé rôle dans le remodelage de la MEC. Deux d'entre eux sont des membres du groupe des protéines matricielles (PMC) qui, plutôt que d'accomplir une fonction structurale, modulent les interactions entre la matrice et la cellule en se liant à d'autres PMC, aux récepteurs de surface cellulaire, aux protéinases et aux cytokines (Bornstein et Sage, 2002). La famille des PMC inclut : THBS-1, THBS-2, "tenascin-C", "osteopontin" ainsi que SPARC (Kyriakides et Bornstein, 2003; Murphy-Ullrich, 2001). Tous auraient un rôle lors de la réparation tissulaire.

1.4.1 "Thrombospondin-2" (THBS2)

- Introduction :

THBS1 a été découverte en 1971 comme un produit sécrété des granules α des plaquettes (Baenziger et *al.*, 1971). L'existence d'un deuxième membre de la famille THBS a été rapportée par Bornstein et coll. (1991) qui ont trouvé une séquence d'ADNc ayant des similarités et des différences par rapport à celle de THBS1 dans la partie codante. Ce groupe de chercheurs pense que THBS1 et THBS2 auraient des fonctions semblables mais distinctes. La famille THBS compte cinq gènes différents codant pour THBS1, THBS2, "thrombospondin 3" (THBS-3), "thrombospondin 4" (THBS-4) et "cartilage oligomeric matrix protein" (COMP) (Bornstein et *al.*, 2000). L'inhibition de l'angiogénèse représente vraisemblablement le rôle prépondérant de THBS2 (Streit et *al.*, 1999).

- Structure du gène et localisation chromosomique :

LaBell et coll. (1992) ont localisé le gène de THBS2 sur le chromosome 6q27 humain grâce à l'analyse de cellules hybrides somatiques et par hybridation *in situ*. Bornstein et coll. (1991) ont détecté le gène de THBS2 sur la bande A3 du chromosome 17 chez la souris comparativement au gène de THBS1 qui a été repéré sur la bande F du chromosome 2. Les structures des exons et des introns de THBS2 seraient similaires à celles de THBS1; les corrélations entre les exons codants et les

structures modulaires protéiniques seraient aussi semblables pour les deux gènes (Bornstein et *al.*, 1990; Lawler et *al.*, 1991; Bornstein, 1992; Shingu et Bornstein, 1993). Par contre, les séquences des régions du promoteur proximal ont de grandes différences. Jusqu'à présent, aucun rôle physiologique n'a été attribué aux membres de la famille THBS qui auraient subis un épissage alternatif. Adolph (1999) a réussi à identifier un transcrit épissé de THBS2 humaine sans l'exon 3 grâce à une amplification par une réaction en chaîne de polymérase (PCR) d'un mélange d'ADNc commercialement préparé. Ce même transcrit n'aurait pas la partie codante de THBS2 et ne coderait pour aucune autre protéine.

- Protéine (motif, structure et fonction) :

Les protéines des gènes de la famille THBS sont regroupées dans deux sous-familles (homotrimère et homopentamère), THBS2 étant dans la sous-famille d'homotrimères avec THBS1 (Bornstein et *al.*, 2000). THBS1 et THBS2 contiennent un domaine pro-collagène (Figure 1a); PC) et trois répétitions de type I (Figure 1a); I), tandis que les trois autres protéines de la sous-famille d'homopentamère ont quatre répétitions de type II (Figure 1a) et b); II) au lieu des trois de THBS1 et THBS2 (Bornstein et *al.*, 2000). Les répétitions de type I de THBS1 et THBS2 seraient des ligands aux récepteurs de "CD36 molecule (thrombospondin receptor)" (CD36) à la surface cellulaire et ils auraient des propriétés anti-angiogéniques pour THBS1 (Dawson et *al.*, 1997). L'estimation du poids de la protéine de THBS2 chez la souris a été réalisée grâce à un algorithme pour enlever le peptide signal. Cette protéine contiendrait 1154 acides aminés (aa) et son poids moléculaire serait d'environ 128 kDa. Malgré qu'aucune recherche n'a été rapportée sur la composition de THBS2 en carbohydrate, la protéine devrait être glycosylée par une liaison N-liée et O-liée. Par contre, lorsque la chaîne de THBS2 a été séparée par électrophorèse en conditions dénaturantes, le poids moléculaire se situait aux environs de 180 à 200 kDa (O'Rourke et *al.*, 1992; Liska et *al.*, 1994; Lafeuillade et *al.*, 1996). THBS1 se lierait au collagène, fibronectine, laminine, "heparan sulfate", PG, plasminogène, fibrinogène, glycoprotéine riche en histidine, cytokines et facteurs de croissance (Mosher, 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1995;

Hogg et *al.*, 1997). Vu les similarités entre la séquence de THBS1 et THBS2, il se pourrait que THBS2 démontre plusieurs actions et interactions similaires à THBS1. Par contre, très peu est connu au sujet des propriétés de liaisons de THBS2. L'interaction de THBS2 avec MMP-2 aurait une importance pour l'adhésion cellulaire (Kyriakides et *al.*, 1998; Yang et *al.*, 2000). THBS1 activerait TGFB1 latent en s'y fixant, mais THBS2 se liant au TGFB1 latent n'activerait pas ce dernier (Schultz-Cherry et *al.*, 1995). Alors, il serait possible que THBS2 empêche l'activation de TGFB1 par THBS1. THBS2 est une protéine multifonctionnelle localisée entre la surface cellulaire et la matrice environnante, grâce à son habilité à lier des protéinases, ainsi que certaines cytokines (Bornstein et *al.*, 2000). Aussi, la section de la séquence d'acides aminés de THBS2 constituée d'arginine, de glycine et d'acide aspartique (Figure 1a); RGD) permettrait sa fixation aux syndecans et aux intégrines (en particulier $\alpha v \beta 3$) (Chen et *al.*, 1994; Chen et *al.*, 1996). De plus, THBS2 contribue à l'adhésion et la migration cellulaires, dont l'agrégation plaquettaire. THBS2 inhibe la migration ainsi que la prolifération des cellules endothéliales en réponse aux divers facteurs angiogéniques (Volpert et *al.*, 1995; Panetti et *al.*, 1997). Il a depuis été postulé que la capacité de THBS2 à promouvoir la régression vasculaire repose sur une induction d'apoptose de cellules endothéliales dans les plaies en guérison (Jimenez et *al.*, 2000; Noh et *al.*, 2003). Par ailleurs, THBS1, dont la séquence d'acides aminés se rapproche de celle de THBS2, inhibe l'adhésion, la prolifération, la migration ainsi que la formation de structures multicellulaires par les cellules endothéliales (DiPietro, 1997). Tel que mentionné précédemment, THBS1 et THBS2 se lient à de nombreuses protéines de la MEC et à des récepteurs de surface, dont CD36, ce qui pourrait contribuer à l'effet anti-angiogénique des THBS (Jimenez et *al.*, 2000). Par exemple, une interaction directe entre THBS et FGF2 pourrait résulter en la séquestration de cette cytokine pro-angiogénique, inhibant ainsi l'activité anti-angiogénique (Taraboletti et *al.*, 1997).

- Localisation et expression tissulaire/cellulaire :

Des analyses systématiques de la distribution tissulaire et cellulaire de THBS2 n'ont été effectuées que chez la souris. THBS2 a été retrouvée surtout dans

des tissus contenant beaucoup d'éléments de tissus conjonctifs (derme réticulaire, petit et large vaisseaux sanguins, méninge, ligament, péricarde, péri-chondrium, périoste et plèvre) (Iruela-Arispe et *al.*, 1993). Des études immunohistochimiques ont été effectuées durant le développement d'embryon murins avec des anticorps dirigés contre THBS2 intacte et contre le domaine N-terminal de cette même protéine (Kyriakides et *al.*, 1998). Les résultats de cette étude sont semblables à ceux du groupe de Iruela-Arispe et coll. (1993).

- Variation expression protéine/ARNm (*in vitro/in vivo*) :

Le groupe de Kyriakides et coll. (1998) a remarqué que dans le cas d'une faible expression de THBS2, il s'ensuit un délai de coagulation. Par contre, des études menées à ce jour indiquent, de façon surprenante, qu'une réduction de la protéine THBS2 semble améliorer la cicatrisation cutanée, du moins à un stade précoce de la guérison de petites plaies, par l'entremise d'une meilleure angiogénèse mais aussi d'un changement dans l'organisation des fibrilles de collagène (Kyriakides et *al.*, 1999b). Toutefois, notre compréhension des fonctions biologiques de cette protéine demeure incomplète.

- Modèle d'invalidation du gène :

En comparant le derme de souris sauvages par rapport à celui de souris invalidées pour THBS2 (THBS2^{-/-}), THBS2 n'a été détectée qu'aux fibroblastes tandis que THBS2 étaient absente des fibres de collagène et des follicules pileux (Kyriakides et *al.*, 1998; Tooney et *al.*, 1998). De plus, chez les souris THBS2^{-/-}, on a observé histologiquement une augmentation significative de la densité capillaire du derme et des tissus adipeux sous-cutanés (Kyriakides et *al.*, 1998). L'effet anti-angiogénique de THBS2 semble d'autant plus important dans les tissus en voie de régénération, comme l'ont démontré des études investiguant la réponse de souris THBS2^{-/-} à l'implantation sous-cutanée d'un corps étranger (Kyriakides et *al.*, 1999a) ou à la création d'une petite plaie excisionnelle (Kyriakides et *al.*, 1999b). Dans le premier cas, un modèle d'inflammation chronique, les capsules fibreuses se développant autour des implants démontrèrent six fois plus de vaisseaux sanguins

chez les souris THBS2^{-/-}, alors que la deuxième étude a mis en évidence une persistance de nouveaux vaisseaux sanguins plutôt qu'une maturation et/ou une régression telles que démontrées chez les souris contrôles. Il est intéressant de noter que la phase de régression vasculaire chez les souris contrôles coïncidait avec le pic d'expression de la protéine THBS2. En effet, les auteurs concluent qu'il existe une association entre de faibles concentrations de THBS2 et un accroissement de l'angiogénèse durant les phases précoces de la guérison, puis, entre des taux élevés de THBS2 et la résolution de l'angiogénèse durant les phases tardives. De plus, ces concentrations élevées concordent avec la fibroplasie et le remodelage matriciel. Par ailleurs, une modulation de l'activité de MMP-2 par THBS2 pourrait affecter, indirectement, l'adhésion, la migration ainsi que la prolifération de cellules endothéliales (Yang et *al.*, 2000). Dans cette même étude, les fibroblastes dermiques de souris THBS2^{-/-} souffrent d'un défaut d'adhésion et de migration sur de nombreuses protéines de la MEC, notamment la fibronectine, en plus de doubler leur synthèse de MMP-2. Le pouvoir d'adhésion fut retrouvé en rajoutant des inhibiteurs de MMP ou un anticorps neutralisant le MMP-2. De plus, l'introduction de THBS2 sous forme d'ADNc ou de protéine recombinante soluble a corrigé le problème tout en rétablissant les concentrations de MMP-2 à ceux présents dans les fibroblastes de souris de type sauvage. Il est postulé que THBS2 interagit avec MMP-2, séquestrant cette dernière dans la MEC, la rendant ainsi indisponible à la surface cellulaire. Yang et coll. (2001) ont de plus remarqué que le complexe THBS2/MMP-2 s'associe au "low-density lipoprotein receptor-related protein" (LPR), quittant de cette façon l'environnement péri-cellulaire. Par ailleurs, le défaut d'adhésion de fibroblastes dermiques de souris THBS2^{-/-} pourrait expliquer leur inaptitude à contracter des gels de collagène (Kyriakides et *al.*, 1999a). Le rôle joué par THBS2 lors de la guérison de plaie semble complexe puisque ses propriétés anti-angiogéniques ainsi que sa modulation de l'activité de MMP-2 et possiblement celle de TGFβ1 pourraient exercer divers effets sur les mécanismes de guérison. Il est intéressant de noter qu'une absence de THBS1 cause un délai de guérison, possiblement en raison d'une réponse inflammatoire déficiente (Agah et *al.*, 2002).

Spécifiquement, les concentrations de MCP-1 et de TGF β 1 total et actif sont réduites chez des souris THBS1^{-/-}.

1.4.2 "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC)

- Introduction :

SPARC, aussi nommé ostéonectine (ON) ou "basement-membrane protein 40" (BM-40), est une protéine matricielle qui n'est pas constitutivement exprimée, étant présente exclusivement dans les tissus subissant un remodelage continu ou à des sites de trauma.

- Structure du gène et localisation chromosomique :

Swaroop et Francke (1987) ont utilisé une sonde d'ADNc de souris pour isoler, à partir de la génothèque d'ADNc du placenta humain, l'ADNc complet de SPARC. La séquence codante de SPARC, chez la souris, a une forte homologie à celle de l'homme. Mason et coll. (1986) ont localisé SPARC sur le chromosome 11 de la souris et ont montré, grâce à l'analyse par hybridation "Southern", que les polymorphismes de la longueur du fragment de restriction (RFLP) sont pareils à ceux de l'homme. Le groupe de Swaroop et coll. (1988) et celui de Le Beau et coll. (1993) ont précisé que SPARC est localisé au chromosome 5q31-q33 et 5q31-q32 humain respectivement. Le locus SPARC humain serait à proximité des gènes codant pour "acidic fibroblast growth factor" (FGF1), CSF-1, "colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)" (CSF2), "interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)" (IL3), "colony stimulating factor 1 receptor" (CSF1R), "platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide" (PDGFRB) et "adrenergic, beta-2-, receptor, surface" (ADRB2) (Saltman et *al.*, 1993). Dans la majorité des cellules des mammifères, le transcrit de SPARC a un poids moléculaire de 2,1 kilobases (kb), or il existe un autre transcrit minoritaire de 3 kb (Swaroop et *al.*, 1988). Selon Swaroop et coll. (1988), ces deux transcrits polyadénylés ont la même séquence codante pour la protéine, mais le transcrit de 3 kb aurait un signal de polyadénylation en aval. Chez la souris, SPARC a 10 exons et un poids moléculaire de 26,5 kb. Cette grande différence entre SPARC murin et humain est due à la présence chez la souris d'un

premier exon qui est très long, qui n'est pas traduit en acides aminés et qui est constitué d'une région répétitive de CCGT qui stimulerait l'expression de gènes reporteurs (McVey et *al.*, 1988).

- Protéine (motif, structure et fonction) :

SPARC contribuerait à l'organisation de la matrice lors du développement ou de la guérison grâce à sa capacité à se lier à divers éléments de la MEC tels THBS1, la vitronectine, "entacin/nidogen", ainsi que le collagène fibrillaire de types I, II, III, IV et V (Brekken et Sage, 2001). Tout comme THBS, SPARC pourrait altérer la forme cellulaire en tant que facteur contrant l'adhésion, moduler l'activité cytokinique et influencer l'expression de MMP. L'ON de 32 kDa a été découverte par Termine et coll. en 1981 et elle est identique à SPARC. L'ON est une phosphoprotéine fortement conservée entre les espèces. Elle est spécifique aux os et se lie sélectivement à l'hydroxyapatite et aux fibrilles de collagène (Termine et *al.*, 1981). Chez les vertébrés, SPARC est constitué d'environ 298 à 304 aa, dont les 17 premiers constituent le peptide signal. La structure de SPARC compte trois domaines distincts (I, II et III). Le domaine I est constitué des acides aminés 3 à 51 (Figure 2; cylindre) codés par les exons 3 et 4 (Lane et Sage, 1994); il est fortement acide et fixera entre cinq et huit ions calcium. La structure de ce domaine n'est pas encore connue mais les régions en hélice α sont sensibles aux changements de concentration en calcium (Maurer et *al.*, 1992). Cette région N-terminale démontre des épitopes immuno-dominants et est celle qui varie le plus par rapport aux autres membres de la famille du gène SPARC. Le domaine II est constitué des acides aminés 52 à 132 (Figure 2; rouge) codés par les exons 5 et 6 où se localisent 10 cystéines et un complexe carbohydate à N99. On retrouve des régions répétitives comme celles observées dans la follistatine qui induiraient des agrégats (Brekken et Sage, 2001). Les peptides bioactifs situés dans le domaine II de SPARC exercent différents effets sur les cellules endothéliales. Le peptide cationique, constitué des acides aminés 55 à 74 (Figure 2; vert), inhiberait la prolifération des cellules endothéliales (Funk et Sage, 1993). Un autre peptide, formé des acides aminés 113 à 130 et dont une section de sa séquence d'acides aminés est constituée de glycine,

d'histidine et de lysine (GHK) (Figure 2; noir), fixerait le calcium, stimulerait la prolifération des cellules endothéliales et ainsi l'angiogénèse (Funk et Sage, 1993; Lane et al., 1994). De plus, le groupe d'Iruela-Arispe et coll. (1995) a remarqué que la digestion de SPARC avec la plasmine produirait des peptides avec une région GHK, ce qui stimulerait l'angiogénèse. La région N-terminale de ce domaine lierait l'héparine ou des PG importants pour le recrutement de SPARC par ses récepteurs membranaires (Hohenester et al., 1997). Le domaine III, quant à lui, est constitué des acides aminés 133 à 285 (Figure 2; bleu), codés par le septième au neuvième exon, correspondant à une région extracellulaire (EC) contenant deux motifs main-EF qui fixeraient le calcium (Hohenester et al., 1996). Le domaine EC interagit avec les résidus du domaine II de la protéine, stabilisant ainsi la liaison avec le calcium (Hohenester et al., 1997). De plus, une section du domaine EC de SPARC, composé des acides aminés 255 à 274 (Figure 2; jaune), se fixerait aux cellules endothéliales et inhiberait leur prolifération (Kupprion et al., 1998; Motamed et Sage, 1998). Les fibrilles de collagène de type I, III, V et le collagène de type IV de la membrane basale se lient au domaine EC seulement en présence de calcium. Lorsque le domaine III de SPARC est clivé entre L197 et L198, l'affinité de SPARC pour "matrilysin" (MMP-7), MMP-3, MMP-2, "collagenase 3" (MMP-13) *in vitro* et une protéinase non-caractérisée *in vivo* (Sasaki et al., 1997) augmente. De plus, ce clivage donne un meilleur accès aux résidus (R149, N156, L242, M245 et E246) responsables de la fixation du collagène à triple hélices et augmente l'affinité des interactions du collagène (Sasaki et al., 1998). Une identité de 96 % existe entre la séquence d'aa de SPARC porcine et humaine (Chun et al., 2006). En excluant le peptide signal, les 283 aa résultent en un poids moléculaire de 32,3 kDa. SPARC présente un glucose en N113, sept ponts disulfures intramoléculaires et forme des dimères. SPARC inhibe la migration des cellules urothéliales humaines (Hudson et al., 2005). Comme chez l'homme, SPARC porcine est constituée du domaine qui ressemble à la follistatine, du domaine acide fixant le calcium et du domaine EC. Ce dernier aurait deux motifs main-EF; chacun de ces motifs serait responsable de la coordination d'un ion calcium et permettrait la formation d'une structure hélice-boucle-hélice qui influencerait la conformation de la protéine, nécessaire à son

activité biologique (Delostrinos et *al.*, 2006). Cette activité, attribuée au domaine EC, dépend de la coordination de l'ion calcium par les résidus de l'acide glutamique du deuxième motif main-EF.

- Localisation et expression tissulaire/cellulaire :

Les deux principales fonctions de SPARC sont l'inhibition de la progression du cycle cellulaire (Bradshaw et *al.*, 2003) et l'induction d'un nouveau phénotype chez les cellules endothéliales. Ces dernières deviennent rondes menant à l'augmentation de l'espace intercellulaire et favorisant ainsi l'extravasation et l'infiltration de cellules inflammatoires au site de trauma (Goldblum et *al.*, 1994; Brekken et *al.*, 2003). De plus, il appert que la présence de cette protéine en réponse à une injure ou au remodelage tissulaire facilite la production d'une MEC plus permissive à la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ceci pourrait résulter de la substitution de SPARC pour d'autres substrats de la transglutaminase; par exemple, le "cross-linking" de SPARC plutôt que la fibronectine, protéine matricielle à rôle structural, assurerait une MEC moins restrictive. De plus, une exposition prolongée au SPARC amènerait l'arrondissement des cellules ce qui aurait possiblement une importance physiologique durant la cytotinétique ou l'induction de l'apoptose durant le remodelage tissulaire (Sage et Bornstein, 1991). De récentes études suggèrent que SPARC contribuerait également à la fibrose (Zhou et *al.*, 2005). SPARC possède la capacité de stimuler la signalisation de TGFB par l'entremise de la voie dépendante du Smad2/3 (Schiemann et *al.*, 2003). L'expression de SPARC est augmentée lors de divers désordres fibrotiques, incluant la fibrose pulmonaire, la fibrose interstitielle du rein, la cirrhose hépatique, ainsi que le sclérodème/sclérose systémique (Kuhn et Mason, 1995; Pichler et *al.*, 1996; Frizell et *al.*, 1995; Dhore et *al.*, 2001; Zhou et *al.*, 2002). La prédisposition génétique à la sclérose systémique, associée à la sur-expression de SPARC, est possiblement liée à un polymorphisme d'un seul nucléotide spécifique à la région non-traduite 3' de l'ARNm (Zhou et *al.*, 2002).

- Variation expression protéine/ARNm (*in vitro/in vivo*) :

Chez les souris, SPARC a été localisé dans les cellules urothéliales basales, où il modifierait les interactions entre les cellules basales et la membrane sous-urothéliale (Bassuk et *al.*, 2000; Hudson et *al.*, 2005).

- Modèle d'invalidation du gène :

SPARC se lie à diverses cytokines dont FGF2, PDGF et VEGF, abrogeant l'interaction avec leurs récepteurs respectifs, supprimant ainsi leur potentiel mitogénique. Ceci rajoute une dimension à la fonction de SPARC en tant que régulateur de comportement cellulaire. SPARC peut aussi contrôler l'activité de TGFB. En effet, une concentration réduite de TGFB fut mesurée dans les cellules rénales d'animaux invalidés pour SPARC (SPARC^{-/-}) (Bradshaw et Sage, 2001; Brekken et Sage, 2001). Cet effet est contré par l'ajout de protéine recombinante SPARC, qui induit également une augmentation de la synthèse collagénique (Brekken et Sage, 2000). Il est postulé que cet effet de SPARC dépend d'un assemblage inadéquat de la MEC qui résulte en une localisation anormale de TGFB qui nuit à son activation. Le processus de guérison de plaie semble dépendre, en partie, de la présence de cette protéine. En effet, SPARC influence de nombreux mécanismes participant à la guérison, tels la migration et la prolifération cellulaires, le recrutement et la différenciation de cellules mésenchymateuses ainsi que le remodelage de la MEC. Il a été démontré que les souris SPARC^{-/-} subissant de petites plaies excisionnelles exhibent une guérison accélérée où les fibrilles de collagène nouvellement formées sont de faible diamètre (Bradshaw et *al.*, 2002). Cette structure de la MEC pourrait être plus permissive à la migration cellulaire, plus facilement dégradée par les MMP, et possiblement plus facile à contracter, favorisant par le fait même la guérison. Par ailleurs, l'influence de SPARC sur l'activité de TGFB pourrait contribuer à son influence sur la guérison tissulaire. En effet, une inhibition locale de la signalisation de cette cytokine semble améliorer la guérison. De plus, la capacité de SPARC à inhiber PDGF, FGF2 et VEGF, des cytokines nécessaires à la guérison, peut justifier comment l'absence de SPARC peut accélérer le processus. À l'inverse, la fermeture d'une grande plaie excisionnelle de 25 millimètres (mm) était retardée chez des souris SPARC^{-/-} (Basu et *al.*, 2001).

Ce retard fut attribué à un défaut de migration des fibroblastes dermiques menant à un délai de la formation de tissu de granulation et des composants de la MEC. En effet, l'expression des transcrits de la fibronectine et du collagène de type $\alpha 1(I)$ était retardée dans les plaies de souris SPARC^{-/-}. En revanche, la contraction et l'épithélialisation ont progressé normalement. La raison pour laquelle les résultats des deux études s'opposent (Basu et *al.*, 2001; Bradshaw et *al.*, 2002) pourrait relever de la taille des plaies. La perte du caillot de fibrine et de la nouvelle couche épithéliale fut notée à quelques reprises dans les grandes plaies, mais pas dans de plus petites (6 mm) (Basu et *al.*, 2001). Vu le rôle de SPARC en tant que protéine matricielle, des défauts liés à l'interaction cellule-matrice pourraient influencer significativement la guérison de grandes plaies chez les souris SPARC^{-/-}, causant une perte prématurée du caillot et du nouvel épiderme prolongeant ainsi le processus de guérison. Un même défaut pourrait passer inaperçu dans les petites plaies où l'épithélialisation est de moindre envergure.

Finalement, puisque THBS2 et SPARC partagent un rôle dans l'induction de la dissociation cellulaire, Puolakkainen et coll. (2005) ont investigué la réponse de souris, invalidées à la fois pour THBS2 et SPARC, au trauma cutané. Ils ont noté une guérison de plaie rapide due à une épithélialisation accélérée et une altération de la MEC.

1.4.3 Lumican (LUM)

- Introduction :

LUM est un PG à base de kératanes sulfates, membre de la famille des petits PG interstitiels riches en leucine (SLRP). Plus de 25 gènes distincts du génome mammifère codent pour un noyau protéique ayant au moins une chaîne glycosaminoglycane (GAG) qui, par liaison covalente ou non, forme un PG (Iozzo et Murdoch, 1996; Voet et Voet, 1998). Les PG sécrétés dans l'environnement péri-cellulaire sont classés dans deux sous-familles selon la structure générale et les propriétés biologiques de leur noyau protéique, soit : les SLRP et les petits PG modulaires. Les SLRP sont des petits PG omniprésents, ayant un noyau protéique comprimé où s'alternent des résidus d'acides aminés hydrophobiques et

hydrophiliques. La sous-famille SLRP compte la décorine, la biglycane, la fibromoduline, LUM et "epiphycan" ou PG-Lb comme membres.

- Structure du gène et localisation chromosomique :

Les SLRP seraient situés sur au moins trois chromosomes, la décorine et LUM étant sur le même soit, respectivement entre 12q21 et 12q23 chez l'homme (Danielson et *al.*, 1993; Grover et *al.*, 1995) ainsi que sur une région synthétique du chromosome 10 chez la souris (Scholzen et *al.*, 1994; Chakravarti et Magnuson, 1995). Quant à eux, biglycane et fibromoduline sont respectivement sur le chromosome X et 1q33 humain (McBride et *al.*, 1990; Sztrolovics et *al.*, 1994). Chez l'homme, LUM et la fibromoduline sont codés par trois exons dont la région avec des répétitions riches en leucines (LRR) se retrouve dans l'exon central d'environ 1 kb (Antonson et *al.*, 1993; Grover et *al.*, 1995). Le premier intron de LUM humain de 2,2 kb se trouve à 21 paires de bases (pb) devant le site d'initiation de la traduction et le deuxième intron de 3,5 kb se situe à 152 pb avant les codons de terminaison (Grover et *al.*, 1995). Le gène LUM humain est constitué de 7,5 kb (Grover et *al.*, 1995).

- Protéine (motif, structure et fonction) :

Le noyau protéique est constitué de trois régions : N-terminale (Figure 3; NH₂), domaine central et C-terminale (Figure 3; COOH). La région N-terminale contient les chaînes GAG ou de tyrosine sulfate (Figure 3; Y) chargées négativement. Le domaine central est constitué d'un nombre variable de LRR (Figure 3; ellipse noir) flanquées d'amas de cystéines (Figure 3; C), responsables de la majorité des rôles biologiques de LUM. Les fonctions de la région C-terminale sont très peu connues (Iozzo et Murdoch, 1996). La région N-terminale de la décorine, de la biglycane et de "epiphycan" est constituée d'une à deux chaînes GAG qui deviendraient des dermatanes sulfates (DS) ou des chondroïtines sulfates. Les DS sont constitués de plusieurs répétitions de disaccharides d'acide iduronique et de GalNAc. À l'opposé, la fibronectine et LUM ont des tyrosines sulfates qui apporteraient un domaine négatif semblable aux autres PG de la même sous-famille.

Cette région serait directement impliquée lors d'interactions avec les domaines cationiques de la MEC ou avec les protéines à la surface cellulaire. La région centrale des SLRP est un domaine avec quatre amas de résidus de cystéines fortement conservés et espacés d'environ 20 aa (Figure 3). Parmi les SLRP, l'homologie de la section centrale est de 80%. La fibronectine et LUM sont particuliers puisqu'ils ont des chaînes de kératanes sulfates (Figure 3; zigzag) N-liées dans cette région. Chez les protéines avec des LRR, les amas de cystéines apporteraient des propriétés adhésives (Kobe et Deisenhofer, 1994). "Epiphycan" est le seul SLRP à avoir huit LRR alors que tous les autres, incluant LUM, ont dix LRR. Plus de 40 produits géniques contenant des LRR ont été trouvés, ceux-ci étant présents dans les domaines intracellulaire, transmembranaire ou comme éléments sécrétés par des cellules mammifères, végétales ou encore par des procaryotes et des levures (Kobe et Deisenhofer, 1994). Une LRR peut présenter entre 20 et 29 résidus d'aa, tandis que les SLRP possèdent généralement 24 aa. LUM et la fibromoduline présentent de très fortes similarités dans leur séquence protéique (Antonson et *al.*, 1993; Grover et *al.*, 1995). Les différents rôles que joue LUM dans la fibrillogénèse du collagène peuvent être attribués à chacune de ses sous-unités, soit son noyau protéique et ses chaînes GAG. Le noyau protéique de LUM interagirait avec le collagène afin de limiter le diamètre de ses fibrilles (Rada et *al.*, 1993), tandis que ses chaînes GAG, grâce à leur capacité de rétention d'eau, contrôleraient la distance entre les fibrilles de collagène (Scott, 1991). Ces fonctions prodigueraient à LUM la capacité d'assurer, entre autres, la transparence cornéenne ainsi que la force tensile de la peau.

- Localisation et expression tissulaire/cellulaire :

LUM est présent en grande quantité dans une variété de tissus conjonctifs où il peut se lier au collagène, notamment dans le stroma de la cornée et dans la matrice interstitielle collagénique du coeur, de l'aorte, des muscles squelettiques, de la peau et des disques intervertébraux (Chakravarti et Magnuson, 1995).

- Variation expression protéine/ARNm (*in vitro/in vivo*) :

Des études ont été effectuées pour analyser le contenu d'ARNm de la MEC pour une meilleure compréhension du processus de la guérison ligamentaire. En effet, il a été démontré que les concentrations tissulaires d'ARNm pour LUM sont élevées de façon significative (280%) à la troisième et la sixième semaine suivant une lésion ligamentaire chez le lapin et que les valeurs normales (contrôles) ne sont retrouvées que huit semaines plus tard (Boykiw et *al.*, 1998). Boykiw et coll. (1998) attribuerait cette modification de l'expression de LUM à un changement dans l'assemblage de la MEC durant la guérison ligamentaire, puisque LUM inhiberait la fibrillogénèse de collagène *in vitro* (Rada et *al.*, 1993).

- Modèle d'invalidation du gène :

Selon Ezura et coll. (2000), l'absence de LUM chez des modèles d'animaux transgéniques résulterait en une fragilité accrue de la peau en raison d'une défectuosité de la fibrille collagénique. Divers mécanismes qui sous-tendent le processus de guérison de plaie peuvent dépendre, en partie, de la présence de LUM. Par exemple, LUM encourage la réponse inflammatoire de la cornée via une modulation du recrutement de leucocytes, de leur synthèse de médiateurs inflammatoires dont TNF et IL1B, ainsi que de l'apoptose. À cet effet, la guérison cornéenne est ralentie chez la souris invalidées pour LUM (LUM^{-/-}) (Vij et *al.*, 2005). De plus, la présence de LUM dans ce tissu favorise l'adhésion et/ou la migration des cellules épithéliales durant la phase proliférative; l'absence de LUM retarde donc l'épithélialisation cornéenne (Saika et *al.*, 2002; Yeh et *al.*, 2005). Finalement, LUM participe à la phase de remodelage via ses effets déterminants sur la fibrillogénèse du collagène. Il appert donc que la contribution de LUM à la guérison s'échelonne sur toutes les phases en raison des divers rôles qu'il joue.

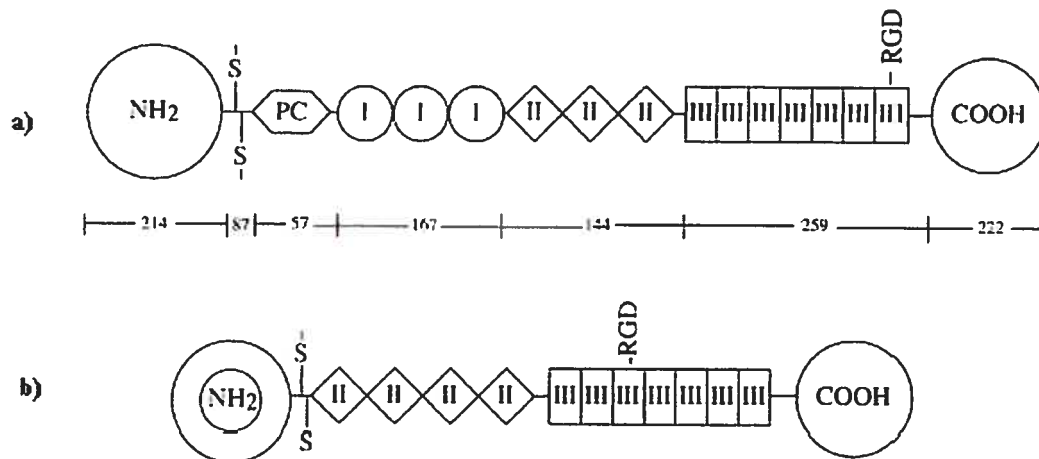


Figure 1 Structure de "thrombospondin" (THBS). a) "thrombospondin 1" (THBS1) et "thrombospondin 2" (THBS2). b) "thrombospondin 3" (THBS3), "thrombospondin 4" (THBS4) et "cartilage oligomeric matrix protein" (COMP). Domaines de THBS : N-terminal (NH₂); pont disulfure inter-chaîne (S); domaine pro-collagène (PC); répétition de type I (I); répétition de type II (II); répétition fixant le calcium (III); séquence d'arginine, de glycine et d'acide aspartique (RGD); C-terminal (COOH). Le nombre d'acides aminés de chaque domaine de THBS2 chez la souris est indiqué sous la figure a). La région RGD est présente sur la troisième répétition de type III de COMP humain et bovin, de THBS4 humain, mais elle est absente de THBS3 chez la souris. Les cercles du domaine N-terminal illustrent la variation du domaine pour THBS3, THBS4 et COMP. Cette figure a été modifiée de la Figure 1 de Bornstein et coll. (2000).

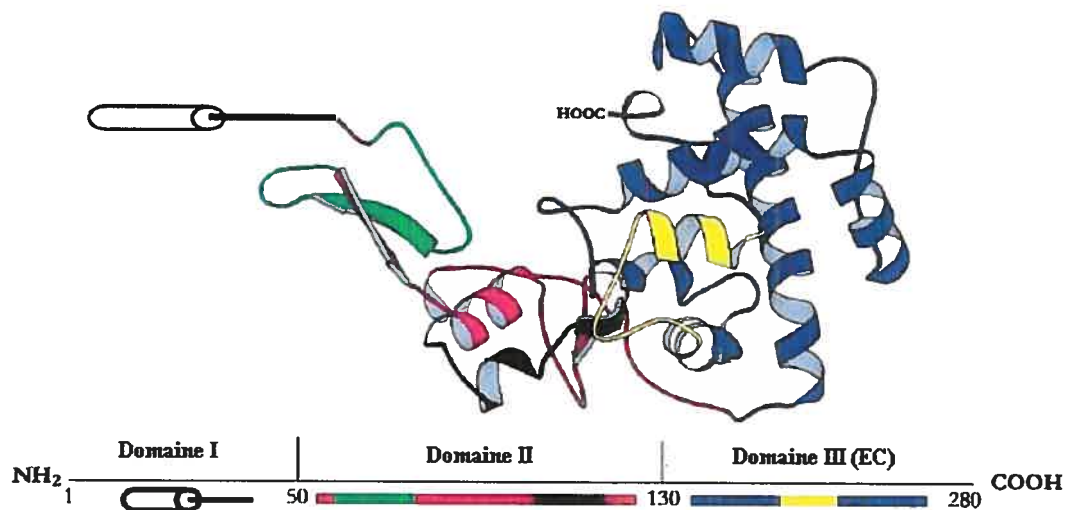


Figure 2 Structure de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC). Le domaine N-terminal (NH₂); domaine I est constitué des acides aminés 3 à 51 (cylindre); le domaine II est constitué des acides aminés 52 à 132 est en rouge sauf le peptide cationique constitué des acides aminés 55 à 74 (vert) et le peptide formé des acides aminés 113 à 130 (noir) avec une section de sa séquence d'acides aminés constituée de glycine, d'histidine et de lysine (GHK); le domaine III (EC) est constitué des acides aminés 133 à 285 est en bleu sauf le peptide composé des

acides aminés 255 à 274 (jaune); domaine C-terminal (COOH). Cette figure a été modifiée à partir de la Figure 1 de Brekken et Sage (2001).

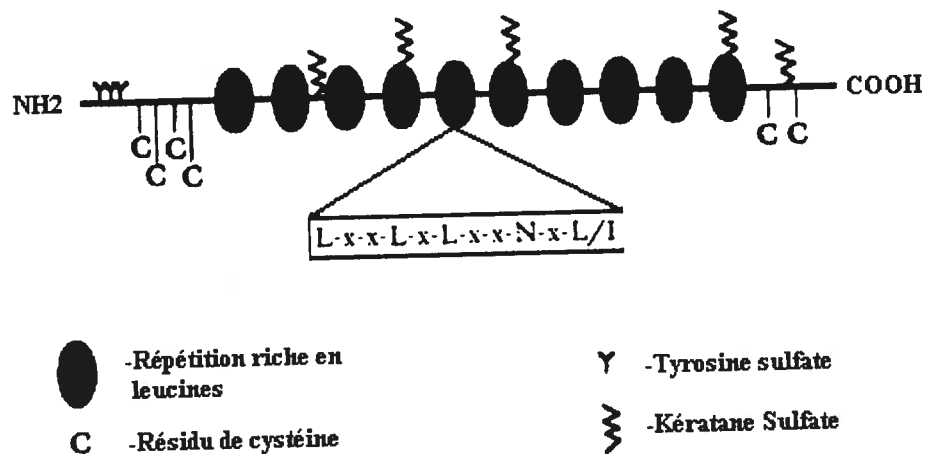


Figure 3

Structure de lumican (LUM). La séquence générale d'une répétition riche en leucines est indiquée dans le rectangle. Région N-terminal (NH₂); C-terminal (COOH). Cette figure a été modifiée à partir de la Figure 1 de Iozzo et Murdoch (1996).

1.5 Hypothèse et objectif

Notre hypothèse générale sous-tend que l'expression temporelle des gènes pour THBS2, SPARC et LUM chez le cheval diffère entre des plaies du thorax qui guérissent normalement et celles du membre qui subissent des délais de guérison.

Nos hypothèses spécifiques sont que :

1) L'expression de THBS2 diminuera légèrement durant la phase proliférative puis augmentera une fois que la phase de remodelage sera amorcée, en raison de son caractère anti-angiogénique. De plus, son expression devrait être inférieure dans les plaies appendiculaires puisque la guérison à cet endroit est souvent lente.

2) L'expression de SPARC sera légèrement supérieure durant la phase proliférative par rapport à la phase de remodelage, en raison du besoin accrue d'infiltration de la plaie par les fibroblastes. De plus, son expression devrait être supérieure dans les plaies appendiculaires puisque la guérison à cet endroit est souvent lente.

3) L'expression de LUM ne changera pas sur le temps puisqu'il est déjà fortement exprimé de manière constitutive dans la majorité des tissus. De plus, son expression devrait être supérieure dans les plaies appendiculaires puisque la guérison à cet endroit est souvent accompagné de surproduction de MEC chez le cheval.

L'objectif à long terme du programme de recherche est d'identifier les fonctions de gènes clés dans les mécanismes régissant la guérison, tels l'angiogénèse, la fibroplasie et l'épithélialisation, de façon à pouvoir positivement influencer la guérison cutanée chez le cheval en ciblant certaines molécules. Les objectifs précis de cette étude sont de cloner l'ADNc complet de THBS2, de SPARC et de LUM afin d'analyser les variations d'ARNm dans le temps et diverses conditions de guérison, soit, les plaies au thorax qui guérissent normalement, les plaies aux membres qui guérissent avec un certain délai et qui développent un "bouton de chair".

2 Méthodologie

2.1 Modèle animal et échantillons

Quatre juments "Standardbred" âgées de deux à trois ans ont été utilisées pour l'expérimentation qui respectait les politiques et les normes de l'Université de Montréal, en conformité avec les principes et recommandations du "Conseil canadien de protection des animaux" (CCPA).

Avant le début du projet, les animaux ont été vaccinés contre le tétanos, l'influenza et le virus du Nil. Durant l'échantillonnage, les juments ont eu accès au foin et à de l'eau *ad libitum*. Les animaux ont été examinés quotidiennement afin de déceler des signes d'inconforts, des maladies systémiques ou un déplacement du bandage.

Les animaux ont reçu une sédation intra-veineuse (I.V.) au chlorhydrate de détomidine (4 mg I.V.) et au tartrate de butorphanol (10 mg I.V.). Les poils de l'aspect dorso-latéral des deux métacarpes et d'un héli-thorax ont été enlevés au rasoir électrique. Les sites chirurgicaux ont été préparés aseptiquement puis une anesthésie locale a été exécutée à l'aide de chlorhydrate de lidocaïne (Lurocaïne® 20 mg/mL) à raison de 20 millilitres (mL) par site. Cinq plaies excisionnelles pleine épaisseur de 6,25 centimètres carrées (cm²), espacées de 1,5 centimètres (cm), ont été créées avec un scalpel et ont guéri par deuxième intention. La peau excisée de toutes les plaies (semaine 0) a été conservée comme échantillon de peau normale (PN). Toutes les juments ont eu un membre bandé (choisi de façon aléatoire) en période post-opératoire pour induire la formation d'un tissu de granulation exubérant et favorisant la cicatrisation pathologique "bouton de chair" (Barber, 1990; Theoret et al., 2002). Ces bandages ont été changés au moins trois fois par semaine jusqu'à la fermeture complète de la plaie.

Une plaie par groupe (thorax (T), membre non-bandé (M) et membre bandé (MB)) a été prélevée sur tous les animaux aux temps suivants : semaines 1, 2, 3, 4 et 6. Les échantillons du groupe MB représentent le modèle de bouton de chair. Pour éviter d'exacerber l'inflammation, chaque plaie, débutant par la plus distale, n'a été prélevée qu'une seule fois. Un échantillon de pleine épaisseur de huit millimètres

(mm) (trois à quatre millimètres de bord de plaie et trois à quatre millimètres de tissu de granulation au centre de la plaie) a été récolté grâce à un poinçon suivant la sédation et l'anesthésie locale mentionnés plus tôt (Theoret et *al.*, 2001; Theoret et *al.*, 2002). Toutes les biopsies ont été lavées dans une solution saline froide, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'extraction d'acide ribonucléique (ARN).

2.2 Extraction de l'ARN

Comme le résume la figure 4, l'extraction d'ARN total a été réalisée à partir des échantillons de PN ou de bord de plaie (BP) récoltés à la section 2.1. L'extraction d'ARN total a été réalisée en suivant le protocole de Chomczynski et Sacchi (1987), légèrement modifié. Le tissu a été homogénéisé dans 3 mL du tampon dénaturant contenant 4 molaire (mol/L) d'isothiocyanate de guanidium, 0,5% du N-laurylsarcosine de sodium, 0,1 mol/L de β -mercaptoéthanol et 25 millimolaires (mM) du citrate de sodium, pH 7 à l'aide d'un polytron (Kinematica Inc., Newark, NJ). L'homogénat a été déposé sur un coussin de 5,6 mol/L de chlorure de césium, de 0,1 mol/L d'acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA) et centrifugé (267 000g, à 20°C) pendant 4 heures. Le culot d'ARN total a été re-suspendu dans le tampon dénaturant puis extrait au phénol-chloroforme, suivi d'une précipitation de l'ARN (Sambrook et Russell, 2001). La concentration de l'ARN total a été déterminée par densité optique (D.O.) à 260 nanomètres (nm). La qualité de l'ARN isolé a été vérifiée d'une part par le ratio D.O. 260 nm/D.O. 280 nm et d'autre part en examinant les bandes d'ARN ribosomales de 28S et de 18S après la migration d'un microgramme (μg) sur un gel dénaturant de 1% d'agarose contenant 0,74 mol/L de formaldéhyde, 40 mM de MOPS, 0,01 mM d'acétate de sodium et 0,2 mM de EDTA, pH 8. Ces échantillons ont migré à 90 volts (V) pendant environ trois heures puis furent visualisés suite à un transfert sur membrane de nylon chargée (Amersham Biosciences, Bucks, UK) effectué toute la nuit avec le tampon 10X SSC contenant 1,5 mol/L de NaCl, 0,15 mol/L de citrate de sodium, pH 7, et 0,5% de dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Sambrook et Russell, 2001). Après le transfert, la membrane a été rincée dans le tampon 2X SSPE contenant 0,3 mol/L de NaCl, 0,023

mol/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ et 1,7 mM de EDTA, pH 7,4. Par la suite, l'ARN a été fixé sur la membrane grâce à une exposition aux rayons ultra-violet (UV) de 150 millijoules (mJ) ("Spectrolinker"; Spectronics Corporation, Westbury, N.Y.) puis révélé avec une solution colorante contenant 0,02% de bleu de méthylène et 0,3 mol/L d'acétate de sodium, pH 5,5.

2.3 Préparation des sondes

Les sondes d'ADNc utilisées dérivait d'une étude antérieure ciblant l'identification de gènes différentiellement exprimés lors de la guérison cutanée chez le cheval (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005) (Figure 4). Un microlitre (μL) de ces fragments d'ADNc BP (septième jour) du thorax JLL12-H9, JLL11-C2 et JLL6-C5 respectivement correspondant à SPARC, à LUM et à THBS2 ont été amplifiés par PCR dans une réaction totale de 50 μL afin d'obtenir suffisamment d'ADNc pour générer des sondes. Cette amplification a été effectuée grâce à 25 cycles de PCR à 94°C, 15 secondes (sec); 68°C, 30 sec; 72°C, 90 sec à l'aide d'un appareil de type Mastercycler® (Eppendorf AG, Allemagne). Les amplicons ont été séparés sur un gel de 2% d'agarose contenant 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium (EtBr) dans le tampon 1X TAE contenant 40 mM de Tris-Acetate et un micromolaire de EDTA puis ont migré à 80 V pendant environ quatre heures afin d'être visualisés par une exposition du gel aux UV à l'aide du AlphaImager™ 2200. Les fragments d'ADNc ont été extraits du gel d'agarose ("QIAquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Mississauga, ON). La concentration des échantillons d'ADNc a été estimée à l'aide de plaques de EtBr (Sambrook et Russell, 2001). Une courbe standard a été tracée à partir du poids moléculaire en fonction du déplacement sur le gel (Rf) de chaque fragment du marqueur de poids moléculaire 1 kb (Invitrogen). Avec cette courbe, le poids moléculaire des sondes a été déduit avec leur Rf.

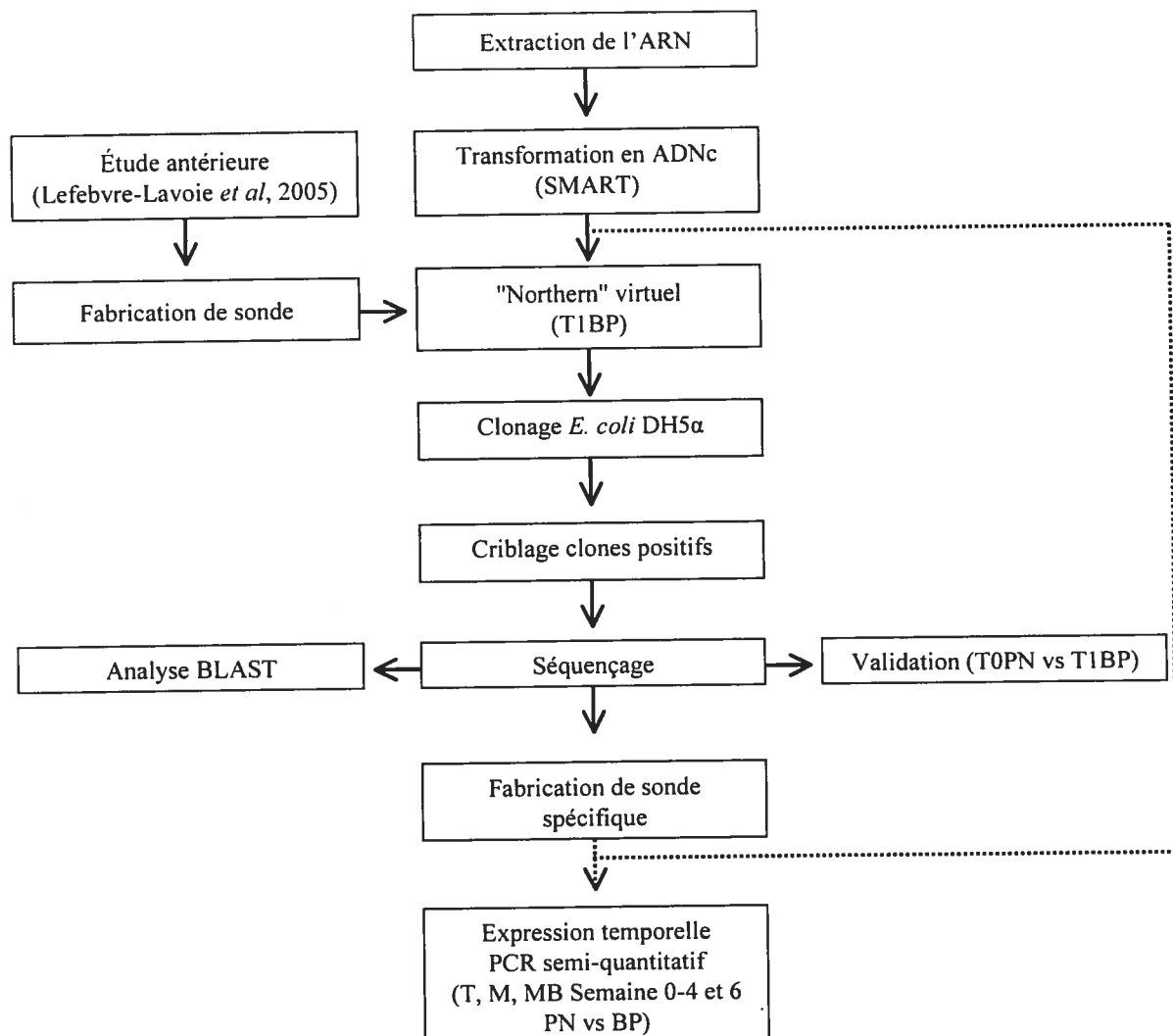


Figure 4

Schéma résumant les étapes de la méthodologie.

Type de biopsie : Peau normale (PN) et bord de plaie (BP)
 Site de biopsie : Thorax (T), membre sans bandage (M) et membre avec bandage (MB).

2.4 Analyse par "Northern" virtuel

L'analyse de l'expression génique fut réalisée par "Northern" virtuel pour déterminer le poids moléculaire de l'ADNc pleine longueur. Pour ce faire, trois pools différents d'ARN totaux ont été formés en regroupant un microgramme d'ARN total d'échantillons de guérison normale du thorax (n = 4); de guérison normale d'un membre (n = 4); ou de guérison avec bouton de chair à un membre (n = 4), à chacune des semaines de guérison. Le "rassemblement" d'échantillons fut réalisé afin de minimiser la variation inter-animale ainsi que les coûts et le temps requis pour convertir l'ARN en ADNc. De chacun de ces pools, un microgramme d'ARN total a été transformé en ADNc à l'aide de la trousse "SMART PCR cDNA synthesis" (Clontech Lab Inc, Palo Alto, CA, USA) (Figure 4 et Tableau II). Donc, les échantillons d'ADNc simple brin ont été amplifiés par PCR dans une réaction d'un volume total de 100 µL. La réaction de PCR a été exécutée avec une dénaturation à 95°C d'une minute (min), suivit de 19 cycles de PCR à 95°C, cinq secondes; 65°C, cinq secondes; 68°C, six minutes à l'aide d'un appareil de type Mastercycler®. L'ADNc de ces amplicons a été concentré grâce à une extraction au phénol-chloroforme. Ces amplicons purifiés ont migré sur un gel de 0,8% d'agarose contenant 0,1 µg/mL de EtBr dans un tampon de 0,5X TBE contenant 45 mM de Tris-Borate et un millimolaire de EDTA puis à 80 V pendant quatre à cinq heures et visualisés aux UV. Suite à la visualisation, le gel a été lavé 30 min dans le tampon de 0,5X TBE, puis deux fois pendant 15 à 20 min dans le tampon de transfert alcalin contenant 0,4 normale (N) de NaOH et un molaire de NaCl. Le transfert alcalin a été réalisé pendant toute la nuit sur une membrane de nylon chargée (Millipore Corporation, Bedford, MA). Après le transfert, la membrane a été lavée dans une solution contenant 0,5 mol/L du Tris, pH 7,5, un molaire de NaCl puis l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été fixé sur la membrane suite à deux expositions aux UV de 150 mJ.

La membrane a été pré-hybridée dans 20 mL de 4X SET contenant 0,6 mol/L de NaCl, quatre millimolaires de EDTA, 0,12 M de Tris pH 7,4, 0,1% de NaPP, 0,2% de SDS et 500 µg/mL d'héparine à 68°C pendant environ quatre à six heures dans un four à hybridation ("Isotemp"; Fisher Scientific International, Hampton,

NH). Environ 100 nanogrammes (ng) de chacune des sondes préparées à la section 2.3, a été marqué par l'incorporation de dCTP- α P³² selon les directives de la trousse "Megaprime DNA labelling system" (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Les sondes d'ADNc radioactives ont été purifiées selon le protocole "QIAquick Nucleotide Removal Kit" ("QIAquick Spin Handbook", Qiagen Inc.). Les sondes d'ADNc ont été dénaturées (100°C, cinq minutes) puis ajoutées à 15 mL de solution d'hybridation qui contenait en plus 10% de dextran sulfate comparativement à la solution de pré-hybridation. L'hybridation a été effectuée à 68°C pendant environ 16 heures. La membrane a été lavée, à 68°C, initialement dans une solution de 2X SSC contenant 0,3 mol/L de NaCl, 0,03 mol/L du citrate de sodium pH 7 et 0,1% de SDS pendant 20 min puis par deux lavages de 45 min à l'aide de la solution de 0,1X SSC contenant 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrate de sodium pH 7 et 0,1% de SDS. La membrane a été exposée à un écran de captage de rayonnement β (Amersham Biosciences) pendant au moins quatre heures suivit d'une lecture au "Storm 840" (Amersham Biosciences). Une courbe standard a été tracée comme à la section 2.3. Avec cette courbe, le poids moléculaire de chaque transcrit a été déduit avec leur Rf minimal et maximal qui ont été mesurés à partir de l'hybridation sur la membrane.

Tableau II Liste d'amorces de la trousse "SMART PCR cDNA synthesis".

Noms	Séquences (5' vers 3')
BD SMART II™ A Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
Nested PCR primer 1	TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT
Nested PCR primer 2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

2.5 Mini-génothèque

Une mini-génothèque a permis d'obtenir l'ADNc complet, de se renseigner sur la longueur du transcrit et de détecter la présence d'isoformes suite à un épissage alternatif. L'analyse initiale de l'ADNc par "Northern" virtuel a permis de détecter un transcrit de 1600 à 1975 pb, de 2150 à 2300 pb et de 2275 à 2400 pb s'hybridant à une sonde d'ADNc correspondant à LUM, à THBS2 et à SPARC, respectivement.

2.5.1 Fabrication de la mini-génothèque d'ADNc

Pour obtenir la mini-génothèque, le protocole établi par Lévesque et coll. (2003) a été suivi. Alors, nous avons refait les étapes d'amplification et de migration décrite à la section 2.4. Le gel obtenu a ensuite été exposé aux UV à l'aide d'un appareil de type FOTO/UV 26 (Fotodyne, Hartland, WI). La ou les sections de l'échantillon correspondant au poids moléculaire de chaque transcrit ont été découpées du gel d'agarose (sous les UV) et purifiées ("QIAquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc.) afin d'obtenir les ADNc souhaités. Par la suite, deux microlitres de l'ADNc purifié a été amplifié par PCR dans une réaction totale de 50 μ L grâce à une dénaturation à 95°C d'une minute, suivi de 12 à 15 cycles de PCR à 95°C, cinq secondes; 65°C, cinq secondes; 68°C, six minutes à l'aide d'un appareil de type Mastercycler®. Dix microlitres de l'amplicon ont été séparés sur un gel de 0,8% d'agarose contenant 0,1 μ g/mL de EtBr dans le tampon de 1X TAE, ont migrés à 120 V pendant deux à trois heures puis ont été transférés sur une membrane comme dans la section 2.4. Cette membrane a servi comme contrôle positif de la génothèque lors de l'hybridation par une sonde spécifique. Le reste de l'amplicon, provenant de la réaction totale de 50 μ L, a été purifié selon le protocole "QIAquick PCR purification Kit" (Qiagen Inc.) et la quantité d'ADN a été estimée à l'aide de plaques de EtBr comme à la section 2.3.

2.5.2 Clonage

Par la suite, quatre microlitres de la purification, de la section 2.5.1, ont été clonés avec la trousse "QIAGEN PCR cloning Kit" (Qiagen Inc.). Environ cinq à dix microlitres de la ligation ont été utilisés pour transformer des bactéries DH5 α (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) selon les recommandations du manufacturier (Figure 4). Par la suite, entre 100 à 125 μ L de cette transformation ont été étalés sur une gélose de 3,4-cyclohexenoesculetin- β -D-galactopyranoside (S-Gal)TM/Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) contenant 40 μ g/mL de kanamycine (Kan) (Sigma-Aldrich) puis incubés à 37°C pour toute la nuit. Les colonies blanches représentent les bactéries ayant le plasmide pDrive qui a incorporé un fragment d'ADN tandis que les bactéries avec un plasmide pDrive seulement forment des colonies noires.

2.5.3 Criblage de la mini-génothèque d'ADNc

Chaque clone positif obtenus suite à la transformation, décrite à la section 2.5.2, a été piqué avec un cure-dent stérile individuellement, l'extrémité infectée du cure-dent a été tempée dans un puit d'une plaque à 96 puits contenant 200 μ L du milieu Hoggness puis les plaques à 96 puits ont été incubées à 37°C pour toute la nuit. Ce milieu Hoggness constitué de 15 mM de sulfate d'ammonium, de 3,48 milligrammes (mg)/mL de potassium phosphate monobasique, de 0,1 mM de MgSO₄, de 9,6 mg/mL de potassium phosphate dibasique, d'une dilution 11/125 de glycérol ReagentPlusTM (Sigma-Aldrich) et de 35 μ g/mL de Kan. Après cette incubation, les plaques à 96 puits ont été piquées avec un repiqueur pour déposer environ un microlitre sur une membrane de nylon chargée se retrouvant au-dessus d'une gélose de 30 mL LB contenant 0,01 g/mL de BD bacto-tryptone, 0,005 g/mL de BD bacto-yeast extract (BD Biosciences), 0,17 mol/L NaCl pH 7,0 et 35 μ g/mL de Kan. Les membranes ont été incubées à 37°C pendant huit heures. Les plaques à 96 puits ont été scellées puis conservées à -80 °C. Les membranes contenant les colonies bactériennes repiquées ont été retirées des plaques et marquées à l'aide d'un stylo à bille vis-à-vis de chaque colonne et ligne de repiquage pour permettre un bon alignement des colonies bactériennes sur la membrane de nylon avec celles se

trouvant dans les plaques de 96 puits. Les membranes sont ensuite été lavées (afin de dénaturer les colonies bactériennes), premièrement en les faisant flotter pendant neuf minutes dans une solution de 0,5 mol/L de NaOH et de 1,5 mol/L de NaCl puis elles ont été submergées pendant une minute dans cette même solution. Par la suite, les membranes ont été submergées dans une solution contenant 0,5 mol/L de Tris-HCl et de 1,5 mol/L de NaCl pendant trois minutes puis elles ont été remises dans la première solution pendant cinq minutes. Les membranes ont été lavées dans la solution contenant 0,5 mol/L de Tris-HCl et de 1,5 mol/L de NaCl pendant trois minutes dans deux contenants différents. Les membranes chargées ont été mises dans une solution contenant 2X SSC pendant deux minutes. Une fois ces membranes séchées, l'ADN a été fixé comme décrit à la section 2.4. Ces membranes ont servi à l'hybridation à l'aide d'une sonde spécifique. La pré-hybridation, la synthèse de la sonde radioactive, l'hybridation, les lavages, l'exposition à l'écran de captage et le traitement au "Storm 840" de ces membranes ainsi que pour les contrôles positifs de la section 2.5.1, ont été effectués comme décrit à la section 2.4 sauf que le four à hybridation "Isotemp" a été réglé à 65°C au lieu de 68°C et l'hybridation a été effectuée sans dextran sulfate 10% (Figure 4). Chaque membrane a été piquée avec quatre plaques différentes à quatre endroits différents de façon à pouvoir identifier le clone qui a réagit après l'hybridation et de localiser la plaque à 96 puits où est conservé ce clone.

Pour les clones positifs porteurs du gène recherché, la moitié des puits dans les plaques à 96 puits conservées à -80 °C, a été incubé dans trois millilitres LB contenant 35 µg/mL de Kan à 37°C pour toute la nuit. Par la suite, les milieux de culture ont été précipités par une centrifugation de 16 060g pendant dix minutes et le culot a été traité avec la trousse "QIAprep® Spin Miniprep Kit" (Qiagen Inc.) afin de récupérer les plasmides. La quantification d'ADN des échantillons solubilisés a été réalisée à l'aide de spectrophotométrie à capillarité ("GeneQuant pro RNA/DNA calculator"; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Cinq microlitres de ces échantillons ont été digérés par 10 unités enzymatiques (U) de EcoR1 (Invitrogen Corporation) à 37°C pour toute la nuit. Après la digestion, ces échantillons ont été séparés sur un gel de 0,8% d'agarose contenant 0,1 µg/mL de EtBr dans le tampon

de 1X TAE puis ont migré à 120 V comme décrit à la section 2.5.1. La digestion permet de distinguer, sur le gel d'agarose, les plasmides pDrive vides de ceux qui ont incorporé de l'ADN lors du clonage et le poids moléculaire du fragment inséré.

2.6 Séquençage et analyse d'homologie

Cinq microlitres de l'échantillon à 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ non-digéré, de la section 2.5.3, ont été séquencés grâce à la méthode de séquençage "dideoxy" (Big Dye Terminator 3.1, ABI Prism; Applied Biosystem PE, Branchburg, NJ) avec les amorces Nested PCR primer 1 et 2R (Figure 4 et Tableau II) à une concentration finale de 0,16 micromolaire (μM) (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005). Les produits de la réaction de séquençage ont été analysés avec "ABI Prism 310 Sequencer" (Applied Biosystem PE). L'analyse d'homologie de la séquence nucléotidique a été effectuée dans les banques de données NR de GenBank avec la fonction BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, dernière consultation : 07/02/2006) (Figure 4). La valeur E représente une valeur statistique. La fonction BLAST rapporte la valeur E plutôt qu'une valeur de probabilité (p) parce qu'il est plus aisé de saisir une différence entre une valeur E de 5 comparé à 10 qu'une valeur de p de 0,0993 lorsque comparée à 0,99995. Toutefois, lorsque $E < 0,01$, les valeurs E et p sont pratiquement identique. La relation entre les valeurs E et p est définie par l'équation $p = 1 - e^{-E}$. Les séquences d'ADNc ont été considérées homologues lorsqu'elles avaient au moins 80% (valeur de E d'environ $1e^{-145}$) de leurs paires de bases semblables aux séquences de GenBank humaines, bovines, canines et murines possédant toute la région codante du gène ou "open reading frame" (ORF). Des amorces (Invitrogen Corporation) sens et anti-sens ont été commandées à partir des résultats du séquençage de façon à poursuivre jusqu'à l'obtention de l'ORF partiel de THBS2, de l'ORF complet de LUM et de SPARC (Tableau III). Pour THBS2, des amorces (Invitrogen Corporation) sens et anti-sens supplémentaires ont dû être commandées pour obtenir toute la partie 5' de l'ORF (Tableau III). Les amorces anti-sens ont été déduites à partir de l'extrémité 5' de THBS2 précédemment séquencée, tandis que les amorces sens ont été déduites à partir des séquences nucléotidiques homologues humaines et bovines pour obtenir un fragment d'environ

1 à 1,8 kb suite à une amplification par PCR dans une réaction d'un volume total de 50 μ L. Les échantillons utilisés ont été celles où l'ARNm de THBS2 aurait le plus de chance d'être complet donc, au moment où l'angiogénèse devrait être terminée. Alors, l'échantillon de bord de plaie au thorax récolté à la troisième semaine (T3BP) et de bord de plaie aux membres non-bandés récolté à la quatrième semaine (M4BP). Cette réaction de PCR a été exécutée avec une dénaturation à 95°C d'une minute, suivie de 40 cycles de PCR à 95°C, cinq secondes; 65°C, cinq secondes; 68°C, 90 sec à l'aide d'un appareil de type Mastercycler®. Vingt-cinq microlitres de ces amplicons ont été séparés sur un gel de 1,5% d'agarose contenant 0,1 μ g/mL de EtBr dans un tampon de 1X TAE puis ont migrés à 120 V comme décrit à la section 2.5.1. Après la visualisation, les fragments d'ADNc de 1 à 1,4 kb de T3BP et de M4BP ont été extraits du gel d'agarose comme à la section 2.3. Par la suite, l'éluat du "Gel Extraction" du mélange des fragments de T3BP et de M4BP a été séquencé par la méthode "dideoxy" avec les amorces (Invitrogen Corporation) sens et anti-sens précédemment utilisées dans l'amplification, à une concentration finale de 0,16 μ M au volume total de 50 μ L (Tableau III).

Tableau III Liste d'amorces sens (-A) et antisens (-1) utilisés pour le séquençage, la validation et l'analyse de l'expression temporelle de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH), de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC), de lumican (LUM) et de "thrombospondin 2" (THBS2).

Noms	Séquences (5' vers 3')
GAPDH (sens)	CAAGTTCATGGCACAGTCACGG
GAPDH (anti-sens)	AAAGTGGTCGTTGAGGGCAATGC
eLUM(G5P11B7#6)-A	ATGAATCCAGGTGCGTTTACTTTCC
eLUM(G5P11B7#6)-1	CATTTGCTACGCGTAGACATTCATAC
eSPARC(G3P2B5#9)-A	ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTC
eSPARC(G3P2B5#6)-1	GTTAGATCACCAGGTCCTTGTCG
eTHBS2(T3BP&M4BP1)-A	GACGGAGACGATGTCTTCAACG
eTHBS2(exp)-1	TCAGTGTGACGTAACGTCG

2.7 Analyse de l'expression génique temporelle (par RT-PCR semi-quantitatif)

L'analyse de l'expression temporelle de SPARC, LUM et THBS2 a été réalisée, en triplicata, à partir des échantillons d'ADNc de tissus provenant de PN (semaine 0) et de BP (semaines 1 à 4 et 6) du thorax, des membres sans et avec bandage. Un microlitre d'ADNc, respectif à chaque gène énuméré précédemment, a donc été amplifié par PCR dans une réaction totale de 25 μ L avec les amorces sens et anti-sens de chaque gène (Tableau III) (Invitrogen Corporation) à une concentration finale de 0,4 μ M (Figure 4) de façon à amplifier un fragment d'environ 500 à 800 pb. Cette réaction de PCR a été exécutée avec une dénaturation à 95°C d'une minute, suivit d'un nombre de cycles respectif à chaque gène, soit 17, 19 et 22 cycles de PCR pour SPARC, LUM et THBS2 respectivement à 95°C, une minute; 64°C, 45 sec; 68°C, 90 sec avec l'aide d'un appareil de type Mastercycler®. Le nombre de cycles nécessaire pour la réaction de PCR de 100 μ l du SMART est déterminé en s'assurant que le gène contrôle constitutivement exprimé "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) soit de même intensité pour tous les pools, soit entre 18 et 23 cycles avec les amorces sens et anti-sens de GAPDH (Tableau III). Les amplicons ont été séparés sur un gel de 1,5% d'agarose contenant 0,1 μ g/mL de EtBr dans le tampon de 1X TAE comme dans la section 2.6 et ils ont été visualisés aux UV. Des photos digitales ont été prises à partir de ces gels et une analyse densitométrique des résultats a été effectuée avec le programme NIH Image (Research Services Branch (RSB) of the National Institute of Health (NIH) : <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>, dernière consultation : 07/02/2006).

2.8 Analyse statistique

La validation a été réalisée à partir des échantillons ADNc de SPARC, de LUM et de THBS2 de tissus provenant de PN (semaine 0) et de BP (première semaine) du thorax et qui ont été séquencés (Figure 4). Les densités de chaque gène (obtenues en effectuant le RT-PCR semi-quantitatif en triplicat pour chacun des gènes), ont été corrigées avec les valeurs des densités de GAPDH. Un test "t"

unilatéral apparié (SAS version 8.2, Cary, NC) a été utilisé pour la comparaison du groupe témoin de la semaine 0 (PN) et le groupe traité de la semaine 1 (BP). Les effets du temps (semaine 0-4 et 6) et du groupe (thorax; membre non-bandée; membre bandée) entre les valeurs corrigées de tous les échantillons équin ont été vérifiées par un modèle linéaire à mesures répétées comme facteurs intra-sujet (SAS version 8.2, Cary, NC).

3 Résultats

3.1 Clonage et caractérisation de l'ADNc équin pour THBS2, SPARC et LUM

Le "Northern" virtuel a permis de déterminer le poids moléculaire approximatif de l'ADNc pleine longueur des trois gènes étudiés chez le cheval. Les mini-génothèques d'ADNc ont été construites selon ces poids moléculaires et leur hybridation a permis de sélectionner les clones contenant un des gènes recherchés, soit THBS2, SPARC ou LUM. Par la suite, leur séquençage a permis de déterminer la séquence en acides nucléiques de chaque gène et la traduction en acides aminés a été estimée à l'aide du programme GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility Version 2.6002).

Les fragments d'ADNc équin JLL6-C5 de 453 pb, JLL12-H9 de 334 pb et JLL11-C2 de 483 pb ont été séquencés lors d'une étude antérieure ciblant l'identification de gènes différentiellement exprimés lors de la guérison de plaies chez le cheval à l'aide de l'hybridation soustractive suppressive (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005). Dans le présent travail, le fragment JLL6-C5 a été utilisé comme sonde dans l'analyse initiale de l'ADNc par "Northern" virtuel pour détecter un transcrit correspondant à la THBS2 ayant un poids moléculaire d'environ 2,15 à 2,3 kb à partir d'échantillons de bord de plaies. L'ADNc d'environ 1950 à 2300 pb a été cloné dans des bactéries DH5 α , générant 1536 bactéries porteuses du plasmide ayant un insert. Parmi eux, quatre clones furent détectés après le criblage de la mini-génothèque d'ADNc dont deux ont été choisis pour la caractérisation de THBS2, suite à l'analyse d'homologie. L'ADN plasmidique a été purifié pour séquencer le

fragment d'ADNc pour THBS2. Suite au séquençage de ce fragment et de plusieurs amplification pour obtenir l'extrémité 5' de la partie codante de THBS2, la caractérisation de THBS2 équien a donné un transcrit de 4613 pb (code d'accension : DQ976362), dont le cadre de lecture ouvert de 2543 pb coderait pour une protéine de 846 acides aminés. La portion 3' non-codante de 2070 pb renferme trois signaux de polyadénylation suivi de la queue poly-A+ (Figure 5). En alignant les séquences d'acides aminés, il appert que la protéine partiellement séquencée de THBS2 équien a une identité d'environ 90% par rapport des protéines semblable chez le chien (code d'accension : XP_541204), la souris (code d'accension : AAH31843), le rat (code d'accension : XP_001055515), la poule (code d'accension : NP_001001755), l'homme (code d'accension : CAI23645), le singe (code d'accension : XP_001096616) et le bovin (code d'accension : NP_789861) (Tableau IV).

Pour ce qui est de SPARC, le fragment JLL12-H9 (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005) a été utilisé comme sonde dans l'analyse initiale de l'ADNc par "Northern" virtuel afin de détecter un transcrit correspondant à SPARC ayant un poids moléculaire d'environ 2,275 à 2,4 kb, à partir d'échantillons de bord de plaies. L'ADNc d'environ 2250 à 2700 pb a été cloné dans des bactéries, générant 1536 bactéries porteuses du plasmide ayant un insert. Parmi eux, huit clones furent détectés après le criblage de la mini-génothèque d'ADNc dont deux ont été choisis pour la caractérisation de SPARC, suite à l'analyse d'homologie. L'ADN plasmidique a été purifié pour séquencer le fragment d'ADNc pour SPARC. Suite au séquençage de ce fragment, la caractérisation de SPARC équien a donné un transcrit de 2148 pb (code d'accension : DQ521572) dont 35 pb sont en 5' non-codant, le cadre de lecture ouvert de 914 pb coderait pour une protéine de 303 acides aminés. La portion 3' non-codante de 1200 pb renferme un signal de polyadénylation suivi de la queue poly-A+ (Figure 6) De plus, l'alignement de séquence d'acides aminés, SPARC équien démontre une identité oscillant entre 90 et 97% par rapport des protéines semblable chez le chien (code d'accension : XP_854982), le singe (code d'accension : XP_001101364), le porc (code d'accension : AAX83050), la souris (code d'accension : XP_995119), le rat (code d'accension : NP_036788), l'homme

(code d'accèsion : NP_003109) et le bovin (code d'accèsion : NP_776889) (Tableau V).

Finalement la caractérisation de LUM a été réalisée lorsque le fragment JLL11-C2 (Lefebvre-Lavoie et *al.*, 2005) fut utilisé comme sonde dans l'analyse initiale de l'ADNc par "Northern" virtuel pour détecter un transcrit ayant un poids moléculaire d'environ 1,6 à 1,975 kb, à partir d'échantillons de bord de plaies. L'ADNc d'environ 1600 à 2000 pb a été cloné dans des bactéries, générant 1536 bactéries porteuses du plasmide ayant un insert. Parmi eux, 12 clones furent détectés après le criblage de la mini-génothèque d'ADNc dont deux ont été choisis pour la caractérisation de LUM, suite à l'analyse d'homologie. L'ADN plasmidique a été purifié pour séquencer le fragment d'ADNc pour LUM. Suite au séquençage de ce fragment, la caractérisation de LUM équin a donné un transcrit de 1799 pb (code d'accèsion : DQ338458) dont 72 pb sont en 5' non-codant, le cadre de lecture ouvert de 1023 pb codant pour une protéine de 341 acides aminés. La portion 3' non-codante de 703 pb renferme un signal de polyadénylation suivi de la queue poly-A+ (Figure 7). La comparaison de la séquence d'acides aminés de LUM équin, avec les autres espèces, démontre une identité d'environ 90% par rapport des protéines semblable chez le chien (code d'accèsion : XP_539716), le singe (code d'accèsion : XP_001102667 et XP_001102753), le chimpanzé (code d'accèsion : XP_509260 et XP_001135206), le babouin (code d'accèsion : ABG77273), le lapin (code d'accèsion : AAC39517), la souris (code d'accèsion : AAH05550), le rat (code d'accèsion : NP_112312), l'homme (code d'accèsion : AAH35997) et le bovin (code d'accèsion : NP_776359) (Tableau V).

1 CTTTTTCGGAAAATGAAACCTGGGTGGTGGACAGCTGCACCAAGTGTACCTGCAAGAAAT
 1 F S E N E T W V V D S C T K C T C K K F
 61 TAAAACCGTTTGCCACCAAATCACCTGCCCCCAGCGACCTGTGCCAACC**CGTCCTTCA**
 21 K T V C H Q I T C P P A T C A N P S F I
 121 **TCGAAGGCGAAT**GCTGTCCGTCCCTGCTTCCACTCAGCAGATGGTGAGGAGGGCTGGTCCC
 41 E G E C C P S C F H S A D G E E G W S P
 181 CGTGGGCAGAGTGGACCGAGTGTCCGCCACCTGTGGGTCTGGCACCCAGCAGAGGGGCC
 61 W A E W T E C S A T C G S G T Q Q R G R
 241 GGTCGTGTGACGTCACCAGCAACACCTGCTTGGGGCCGTCCATCCAGACGCG**GGCATGCA**
 81 S C D V T S N T C L G P S I Q T R A C S
 301 **GCCTGGGCAAA**TGCGACAACCGCATTCGGCAGGACGGCGGGCTGGAGCCACTGGTCGCCTT
 101 L G K C D N R I R Q D G G W S H W S P W
 361 CGTCTCCTGCTCCGTGACCTGTGGGGTGGCAACATCACGCGAATCCGGCTCTGCAACT
 121 S S C S V T C G V G N I T R I R L C N S
 421 CGCCGTTCCCCAGATGGGGG**GCAAGAGCTGCAAAAGGGAGTG**GCCGAGAGACAAAAGCCT
 141 P V P Q M G G K S C K G S G R E T K A C
 481 GCCAGGGTCCCCCTGCCCGATTGATGGGCGGTGGAGCCCCTGGTCCCCGTGG**TCAGCCT**
 161 Q G P P C P I D G R W S P W S P W S A C
 541 **GTACGGTACCTG**TGCTGGGGGGATCCGGGAGCGGACGCGTGTCTGTAACAGCCCGGAGC
 181 T V T C A G G I R E R T R V C N S P E P
 601 GGCAGTACGGAGGGAAGGCCTGCGTGGGGGACATCAA**GGAGCATCAGATGTGCAACAAGA**
 201 Q Y G G K A C V G D I K E H Q M C N K R
 661 GGAGCTGCCCCGTAGACGGCTGCTTATCCAACCCCTGCTTCCGGGAGCTGAGTGCAGCA
 221 S C P V D G C L S N P C F P G A E C S S
 721 GCTTCCCCGATGGGTCTTGGTCCCTGCGGCTCCTGCCAGTGGGCTTCTGGGCAACGGCA
 241 F P D G S W S C G S C P V G F L G N G T
 781 CACACTGCGAGGACCTGGACGAGTGTGC**CGTGGTCACAGATGTCTGCTT**CTCCACGAGCA
 261 H C E D L D E C A V V T D V C F S T S K
 841 AGGCGCACCGCTGCGTCAACACCAACCCGGGGTTCCTACTGCCTGCCGTGCCCCCTCGCT
 281 A H R C V N T N P G F H C L P C P P R Y
 901 ACAAAGGCAGCCAGCCCTTCGGTGTGGGCTGGAGGCGGCCAGGACCGAAAAGCAAGTGT
 301 K G S Q P F G V G L E A A R T E K Q V C
 961 GTGAGCCTGAAAAC**CATGCAAGGACAAGACGCACAGCT**GCCACAAGCACGAGAGTGA
 321 E P E N P C K D K T H S C H K H A E C I
 1021 TCTACCTGGGCGTCTTACAGCGACC**CCATGTACAAGTGCGAGTGCCAGAC**GGGCTACGCAG
 341 Y L G V F S D P M Y K C E C Q T G Y A G
 1081 GCGACGGGCTCATCTGTGGAGAGGACTCCGACCTGGACGGCTGGCCCAACAAGAATCTGG
 361 D G L I C G E D S D L D G W P N K N L V
 1141 TCTGCGCCACCAACGCCACCTAC**CACTGCATCAAGGACA**ACTGTCCCTCCTGCCTAATT
 381 C A T N A T Y H C I K D N C P L L P N S
 1201 CTGGACAAGAAGATTTTGACAAGGACGGCATTGGCGATGCCT**GCGACGATGACGATGACA**
 401 G Q E D F D K D G I G D A C D D D D N
 1261 **ACGATGGCGTCGATGATGAGAAGGACA**ACTGCCAGCTTCTTCAACCCCGTCAATTTG
 421 D G V D D E K D N C Q L L F N P R Q F D
 1321 ACTACGACAAAGATGAGGTTGGGGATCGCTGCGACAACCTGCCCTTACGTGCACAACCCCG
 441 Y D K D E V G D R C D N C P Y V H N P A
 1381 CTCAGATCGACACGGACAACAACGGGGAGGGTGACGCCTGTTCCGTGGACATCG**ACGGAG**
 461 Q I D T D N N G E G D A C S V D I D G D
 1441 **ACGATGTCTTCAACG**AGAGAGACAATTGTCCGTACGTCTACAACACTGACCAGAGAGACA
 481 D V F N E R D N C P Y V Y N T D Q R D T
 1501 CCGACGGCGATGGCGT**GGGTGACCACTGTGACA**ACTGCCCCCTGGTGCACAACCCCGACC
 501 D G D G V G D H C D N C P L V H N P D Q
 1561 AGACTGATGTGGACAATGACCTTGTGGGAGACCAGTGTGACAACAATGAAGACATCGATG
 521 T D V D N D L V G D Q C D N N E D I D E
 1621 AGGACGGCCACCAGAACAACAGGACAACCTGCCCTTACATCTCCAACGCCAACCAGGCCG

541 D G H Q N N Q D N C P Y I S N A N Q A D
1681 ACCATGACCACGATGGCCAGGGTGACGCCTGTGACTCGGATGACGACAACGACGGGGTTC
 561 H D H D G Q G D A C D S D D D N D G V P
1741 CTGACGACAGGGACAACCTGCCGGCTCGTGTCAAACCCGGAGCAGGAGGACTCAGATGGTG
 581 D D R D N C R L V S N P E Q E D S D G D
1801 ATGGGCGGGGCGATGCTTGCAAGGATGACTTTGACAATGACAACATCCCGGATATTGATG
 601 G R G D A C K D D F D N D N I P D I D D
1861 ACGTGTGTCCTGAAAAAATGCCATCAGTGAGACGGACTTCAGGAACTTCAGATGGTCC
 621 V C P E N N A I S E T D F R N F Q M V H
1921 ACTTGGACCCAAAGGGCACCCTCAGATCGATCCCAACTGGGTCATTCGCCATCAAGGCA
 641 L D P K G T T Q I D P N W V I R H Q G K
1981 AGGAGCTGGTGCAGACGGCTAACTCCGACCCTGGCATCGCAGTCGGTTTTTGCAGAGTTTG
 661 E L V Q T A N S D P G I A V G F D E F G
2041 GGTCTGTGGACTTCAGCGG**CACCGTTTTACGTCAACACTGA**CCGGGACGACGATTACGCTG
 681 S V D F S G T F Y V N T D R D D D Y A G
2101 GCTTCGTCTTTGGCTACCAGTCCAGCAGCCGCTTCTATGTGGTGATGTGGAAGCAGGTCA
 701 F V F G Y Q S S S R F Y V V M W K Q V T
2161 CTCAGACCTACTGGGAAGACCAGCCACCCGCGGTACGGCTACTCGGGCGTGTCCCTCA
 721 Q T Y W E D Q P T R A Y G Y S G V S L K
2221 AGGTGGTCAACTCCACCACGGGGACAGGCGAGCACCTGAGGAATGCCCTGTGGCATACTG
 741 V V N S T T G T G E H L R N A L W H T G
2281 GGAACACAGAGGGACAGGTTCTGACTTTATGGCATGACCCTAAAAATATTGGCTGGAAAG
 761 N T E G Q V R T L W H D P K N I G W K D
2341 ACTACACCGCTACAGGT**GGCACCTGACCCACAGACCTAA**GACGGGTTATATAAGAGTCT
 781 Y T A Y R W H L T H R P K T G Y I R V L
2401 TAGTGCATGAAGGAAAACAGGTCATGG**CGGATTTCAGGACCCATCTACGA**CCAACTTACG
 801 V H E G K Q V M A D S G P I Y D Q T Y A
2461 CGGGCGGGCGGCTGGGTCTGTTTGTCTTCTCCCAAGAAAATGGTCTATTTCTCAGACCTGA
 821 G R L G L F V F S Q E M V Y F S D L K
2521 AATACGAATGCAGAGATGTCTAAACCAGATTTGCTGCAATTCAGCAACGTACTGTAGAT
 841 Y E C R D V
2581 GCTGTTACCTACACACCTCAGCCCATCCTGGTCCTTCCAGCTTCTCTCTTAAAGCAGCA
2641 CCTCCTGTCTTGGACCTTGGACCTTGGAGTGGTTCTTCCACCTCTGTGCATCGACCCCAAGCC
2701 **CAAGTGCCTTCAGAGGACAAAATATCG**ATGGAACCCAAAGATGAACATCCAACCCACTACA
2761 GGAAAAACAGTTTGTATGATATACGAGACTTTGTGTGGAGTGGAATTTGAGCATGACATGT
2821 CATTGTTTTATCTTGTGTTGTTAAAAAGAATGACGTTTACATATAAAATGTAATTACTTA
2881 TTGTATTTATGTATATATGGAGTTGAAGGGAATATTTGTGTGTAAGCCATTATCATAAAAT
2941 AAGCAGAAAAATATTGCTACACTATTTTTCAGTGTGAAAGTTGTTCCCTATCTTGGGTT
3001 AGAGCTGTTCTATGGTATTGCACGAATTAGGTCAATTATAAAGAAGGGCCGACTCAAGTC
3061 TGAAGTCAGAACACAGTAAGGAGGAGGCT**GGAGATAGTCGCATGATGCAGGACATCAAT**
3121 TCACTAGTTGGAAACATTAATAAATATGAGAAATAAACAAACACCCCTTCCCTCATTTCT
3181 CTTGTCTTGCAATGAAAGCCCTCATAACCCAGCAGAAATCCGGTTTTCATCCACAAAGGAAA
3241 ATTCCAGCAAAATGGCTCTAACATGAGTCCAGATGTGGGGCTGGCAAAGCCTCCTCTGTG
3301 CGAAAGGTTAACGGAGCAATGGGCTGGCCCTGGAGTTGGCCTCTTGTGCTGTTGTAGACT
3361 TGAGAAAACCTTGGCCAGTTGTTGCTTGACTTTGCTTCTGATCGCCAGAAATTTTGGCTT
3421 GAGCTTCTTCCCAATCTGCGCTCCTGGATGGAGAATGGACAAGCAGACAAACGCATCAG
3481 CTGATGAACCTTGGCATCGAATTCCTATTCTAGGCTTTGAAGCTCTGGAAAATTTGCTTC
3541 TACCTAATTTGGTAACACATGCATTAAGGTTCCAGTTATAAAATGTTTTGCTAATAATTTA
3601 TTAATGATACAGAATGCAGTTCATTCACCAATAACTTATTTTAAATATGCCAAGTAA
3661 CACATATGTAGCATAATTTCTAGAAAATAAACGTATAACAAATCTATAATATAAAGATACA
3721 GTTGCAGCAAAATATCTTCCCATTAAAAATACCAGGATTTATAATATTTATGTTGTGCATGAT
3781 AAAGCATGCTATAAAATGTAATAGAATAAATAAATAAATAATGAAGAGTTTATAATGGAAC
3841 CTTAATATATACTGTTGCCAGTGACTTTAATTCATATTTTTTACTATATCTATCTGCT
3901 GTACATAGAATTTAAAAACTTTAATGCTAAGGAAAAATCAGTTTTAAGTTTT**GCCAGA**
3961 **CACACCCATTAACCA**GCATAGTGATATACGTAAGTTGATTTATTTTTGCTTAAATCGC
4021 ATGATTTTTGTGCAGGAAATGTTAGTTATTTCTCACTCCACATAAGGGGTTAATAAGAGA
4081 AGTTTTGTCTTTTCTGTCTGATTTGGGGCAAAATCTTCTCCTCTTCTATTCATAACGATC

4141 TCATTTCTACATCAAATACAGGGGACCCATCACTTTTGTCTCTCTTTACACGTTTCATTT
4201 TGATAAAGTTACGTTTCTTGCTTCTTTTTGTTTTGCTGCACTATTTTTGCATTTTTTTGTG
4261 GAACTGTATCCCAAGACAGCAAAGGTTGGGAGCCTTCATTTAAATGTAGCCATTGTGAAG
4321 AGGTGGTAGGTCTTCTGTGTTGGTGGTATTTGGCCAAACCATACAGTGGTGTGGGATGCT
4381 GATGTGAATATTTAGAATGTACCATATTTTTTTTTGTAATAATTATTTATGTTTTTTTTTTTT
4441 AAACAACTTTCTCGTACAGGTGGATGAAAGTTCATTTGTTTTGCCAAAGACTGTAAATA
4501 TTTATTTATTTGTTACATGGTCAGAATTTACCACCTGAAACCCTACATTTAGACAGAGC
4561 CTCATTTTTTATACTTTCAAGATTAATAAGAGGAAATAAAATTGTA AAAAGGTTT

Figure 5 Séquences en acides nucléiques et aminés de "thrombospondin 2" (THBS2) équin. L'ADNc partiel de THBS2 équin correspond à 4613 pb, dont le cadre de lecture ouvert de 2543 pb codant pour une protéine de 846 acides aminés. La portion 3' non-codante de 2070 pb renferme trois signaux de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A+. Les sections utilisées pour créer les oligonucléotides ayant servies aux séquençages sont inscrites en bleu pour les oligonucléotides sens et en rouge pour les oligonucléotides anti-sens. L'ordre de la séquence en acides aminés (chiffre pâle), celui de la séquence d'acides nucléiques (chiffre en gras) sont indiquées à gauche et les chiffres en gras négatifs sont des acides nucléiques en 5' non-codant.

Tableau IV Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de "thrombospondin 2" (THBS2) équin avec celle des autres espèces. L'identité représente un pourcentage estimé de l'homologie des séquences d'acides aminés équines comparées à toutes celles du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) via la fonction BLAST, la valeur E représente une valeur statistique ($p = 1 - e^{-E}$) et la référence est le code d'accension de la protéine. Les exposants de la colonne "Identité" représentent des protéine autres que THBS2, soit :
 1. "Similar to thrombospondin 2 precursor"

Espèce	Identité (%)	Valeur E	Référence
Bos taurus	95	0.0	NP_789861
	88	0.0	CAA65385
Canis familiaris	89 ¹	0.0	XP_541204
Gallus gallus	86	0.0	NP_001001755
Homo sapiens	94	0.0	CAI23645
	94 ¹	0.0	NP_003238
Mus musculus	93	0.0	AAO16244
	93	0.0	NP_035711
	95	0.0	AAH31843
Macaca mulatta	87 ¹	0.0	XP_001096616
Rattus norvegicus	93 ¹	0.0	XP_214778
	93 ¹	0.0	XP_001055515

-35 GAGCCGCCTGCCCGCCACTGAGGGTTCCCAGCAC

1 ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGAAGGGCTTTGGCAGCCCCCTCAG

1 M R A W I F F L L C L A G R A L A A P Q

61 CAGGAAGCCCTGCCTGATGAGACAGAGGTGGTGGAGGAAACCGTGGCTGAGGTGTCCGAG

21 Q E A L P D E T E V V E E T V A E V S E

121 GTACCTGTGGGAGCCAACCCGTCCAGGTGGAAGTAGGAGAATTTGACGAAGGTGCTGAG

41 V P V G A N P V Q V E V G E F D E G A E

181 GAAGCTGAAGAGGAGGTGGTGGCTGAAAACCCCTGCCAGAACCACCACTGCAAACACGGC

61 E A E E E V V A E N P C Q N H H C K H G

241 AAGGTGTGTGAGCTGGATGAGAACAACAGTCCCATGTGTGTGTGCCAGGACCCTACCAGC

81 K V C E L D E N N S P M C V C Q D P T S

301 TGCCCTGCCCCCATTTGGCGAGTTTGAAGGTGTGCAGCAATGACAACAAGACCTTCGAT

101 C P A P I G E F E K V C S N D N K T F D

361 TCCTCCTGCCACTTCTTTGCCACCATGTGCATCTGGAGGGCACGAAGAAGGGCCACAACG

121 S S C H F F A T K C T L E G T K K G H K

421 CTCCACCTGGACTACATCGGGCCTTGCAAATACATCCCCCCTGCCCTGGACTCCGAGCTG

141 L H L D Y I G P C K Y I P P C L D S E L

481 ACCGAATCCCCCTGCGCATGCGGGACTGGCTCAAGAATGTCTGGTCACTCTGTACGAA

161 T E F P L R M R D W L K N V L V T L Y E

541 AGGGATGAGGGCAACAACCTTCTGACCAGAGAAGCAGAAGCTGCGAGTGAAAAAGATCCAC

181 R D E G N N L L T E K Q K L R V K K I H

601 GAGAATGAGAAGCGCCTGGAGGCTGGAGACCACCCAGTGGAGCTGCTGGCCCCGGACTTC

201 E N E K R L E A G D H P V E L L A R D F

661 GAGAAGAATAACAACATGTACATCTTCCCGTGCCTGGCAGTTTGGCCAGCTGGACCAG

221 E K N Y N M Y I F P V H W Q F G Q L D Q

721 CACCCATTGATGGGTACCTGTCCACACGGAGCTGGCCCCACTGCGTGCACCCCTCATC

241 H P I D G Y L S H T E L A P L R A P L I

781 CCCATGGAGCACTGCACCACCCGCTTCTTCGAGACCTGTGACCTGGACCATGACAAGTAC

261 P M E H C T T R F F E T C D L D H D K Y

841 ATCGCCCTTGATGAGTGGGCCGGCTGCTTCGGCATCAAGTGACGCAGGATATCGACAAGG

281 I A L D E W A G C F G I K E Q D I D K D

901 ACCTGGTGATCTAACCTCCTGCCTCCTTCTGCAGGCACACGAGAGAATTTCTCACCTCTC

301 L V I

961 TGACCTTCCCCTTCTGTTCCTTCCCCAATGTTTAAAAATGTTTGGATGGTGTGTTGTTCTGC

1021 CTGGGGACAAGGTGCTAACATAGATTTAAATGAATACATTAACGGTGCTAAATACGGAAA

1081 TTTTAAACCAAGTCATGACACTCTTAGTGTAGCTCCGCTATCAAGGCCCTTGTCTACC

1141 CACTAACGGTCCCATTFTTCTCTTGCCTCTTGCAGCATTGCTCATCGTCTTGGTGGCCTA

1201 TGGGTGGGAACCTGATCTGCTCAAGTCCGCCTTCAACACATACTGCATCTTCAGATTTTCT

1261 CTCTATTTCTCTCTTTGAAACTAATACTACCAAGTCAGACTTTGTGTTAATTTTATATG

1321 TAGGGTATTGGCTGCCAGGGGGTGGGGTGGGTCTTCTCACGTGACTTGAAGTTGGGCAA

1381 AGGGAAGTAACAGATACTGACGTTGGCAAGGACATTTCTGGGACGAGAGAACCCTGTGGT

1441 GTAGAAATCCCTGCAGATGCCATCAACCAGAACCACAGATAACACGTCTGTTTGCCTGGG

1501 GCTGTAACCTGAGAGAAAAGAACCTGGGGCTGTGTTAGGAAAAGTCTGTAACCTCTCACAGGA

1561 ACCCAGCCCCCTCACCGTTTCTTCCCTCACTTTCAGGGCCATTTCTTTTTCACATTAGGCT

1621 GTTGTTCAAACTTTTGGGAGCTGTGGCCACAGTTCTCTGGAAGCTGGGAATCTCCAGGA

1681 CTCTGGGGGGTGGATCCGCACATTTACAGGGCTTCTCTCTCCGAAACCGTCTTGGGAG

1741 ATGCTGGCTGGGCTGTTTTCAGCCAGGAAGGCCAAAATCAAGGGTGAAGCGTAGAAAAGTTG

1801 TAAAAATAGAAAAAGTGGAGTTGGTGAATTTGGTTTTGTTTTTGGGTTTTTCTTTTTTTTC

1861 CCGTTTTGGATGGCTGTCTTGAAGGGTCTTTCCCTCGGTTTTCTAGCATGTTCTCTCTCTT

1921 TTCTCCCTCTGCCCTTTTTCTTTTAAATAATCAAGAGAACTTCAAAGTCAATGGGATGG

1981 TCGGATCTCACAGGCTGAGAACTCGTTACCTCCAAGCATTTTCATGAAAAAGCTGCTTCT

2041 TATTAATCATGAAACTCTCGCCATGATGTGAAGAGTTTGACAAATCTTTCAAAAATAAAA

2101 AGTAAGGACTTAGA

Figure 6

Séquences en acides nucléiques et aminés de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin. L'ADNc de SPARC équin correspond à 2148 pb dont 35 pb sont en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 914 pb codant pour une protéine de 303 acides aminés. La portion 3' non-codante de 1200 pb renferme un signal de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A+. Les sections utilisées pour créer les oligonucléotides ayant servies aux séquençages sont inscrites en bleu pour les oligonucléotides sens et en rouge pour les oligonucléotides anti-sens. L'ordre de la séquence en acides aminés (chiffre pâle), celui de la séquence d'acides nucléiques (chiffre en gras) sont indiquées à gauche et les chiffres en gras négatifs sont des acides nucléiques en 5' non-codant.

Tableau V

Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin avec les séquences d'autres espèces. L'identité représente un pourcentage estimé de l'homologie des séquences d'acides aminés équines comparées à toutes celles du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) via la fonction BLAST, la valeur E représente une valeur statistique ($p = 1-e^{-E}$) et la référence est le code d'accension de la protéine. Les exposants de la colonne "Identité" représentent des protéine autres que SPARC, soit :

1. "Similar to SPARC precursor (Secreted protein acidic and rich in cysteine, Osteonectin (ON), Basement-membrane protein 40 (BM-40))";
2. "SPARC precursor (Secreted protein acidic and rich in cysteine, Osteonectin (ON), Basement-membrane protein 40 (BM-40))";
3. "Osteonectin";
4. "Osteonectin precursor"

Espèce	Identité (%)	Valeur E	Référence
Bos taurus	97	0.0	AAI07530
	97	0.0	NP_776889
Canis familiaris	97 ¹	0.0	XP_854982
Homo sapiens	96	0.0	NP_003109
	96 ²	0.0	P09486
	95	0.0	AAA60993
Mus musculus	90	0.0	NP_033268
	95 ¹	0.0	XP_995119
Coturnix coturnix	92 ²	0.0	P36233
	86 ⁴	0.0	AAD12179
Rattus norvegicus	91	0.0	P16975
	92	0.0	NP_036788
	90 ³	0.0	BAA06029
Xenopus tropicalis	79	0.0	NP_989347
Rana catesbeiana	79	0.0	BAD10858
Macaca mulatta	92	0.0	XP_001101364
Gallus gallus	84	0.0	NP_989741
	84	0.0	S39539
Sus scrofa	96	0.0	AAX83050

-72 GATAGTGCATCT
-60 GCTTTAAGAATTAACGAAAGCAGGTGTCAAGACAGTAAGGATTCAAAGCATTTCCTCCAAAA
1 ATGAATCCAGGTGCGTTTACTTTCCCTCTGGCATTGATCAGTGGTACCAGCGGCTACTAC
1 M N P G A F T F L L A L I S G T S G Y Y
61 TACGACGATTATGATTACAATATCCCCCTATCGATTTATGGGCGATCATCACCAAACGTG
21 Y D D Y D Y N I P L S I Y G R S S P N C
121 GCACCAGAAATGTAAGTGCCTGAAAGCTATCCAACAGCCATGTATTGCGATGAACTGAAA
41 A P E C N C P E S Y P T A M Y C D E L K
181 CTGAAAAGTGTGCCAATGGTGCCTCCTGGAATCAAGTACCTTTACCTTCGGAATAACCAG
61 L K S V P M V P P G I K Y L Y L R N N Q
241 ATTGACCATATTGATGAAAAGGCCCTTTGAAAATGTAACCGATCTACAGTGGCTCATTCTA
81 I D H I D E K A F E N V T D L Q W L I L
301 GATCATAACCTCCTAGAAAATCCAAGATAAAAAGGAAGAGTTTTCTCTAATTGGAACACTG
101 D H N L L E N S K I K G R V F S K L E Q
361 GAGAACTGCACATAAATCACAACAATCAGACAGAATCTGTGGGCCCCACTTCCCAAATCT
121 L E K L H I N H N N Q T E S V G P L P K
421 CTGGTGGACCTGCAGCTTACTCACAACAAGATCACGAAGCTCGGCTCCTTTGATGGACTG
141 S L V D L Q L T H N K I T K L G S F D G
481 GTAAACCTGACCATGGTCCATCTTCAACACAATCAACTGAAAGAGGATGCCATTTTCAGCT
161 L V N L T M V H L Q H N Q L K E D A I S
541 GCTTTTAGAGGTCTTAAGTCCCTTGAGTACCTTGACTTGAGCTTCAATCAGATGAGCAAAA
181 A A F R G L K S L E Y L D L S F N Q M S
601 CTGCCACAGGTCTCCCCGTCTCTCTTCTGGCTCTCTATTTAGACAACAATAAGATCAGC
201 K L P T G L P V S L L A L Y L D N N K I
661 AACATCCCTGATGAGTATTTCAAGCGTTTTAATGGACTGCAGTATCTACGTTTATCTCAT
221 S N I P D E Y F K R F N G L Q Y L R L S
721 AATGAGCTAGCTGATGGTGAATACCTGAAAATCTTTTAATGTCTCCTCTCTGCTTGA
241 H N E L A D G G I P G N S F N V S S L L
781 CTGGATCTCTCCTATAACAAGCTTAAAAACATACCGACTGTCAATGAAAACCTTGAAAA
261 E L D L S Y N K L K N I P T V N E N L E
841 TATTACCTGGAGGTCAATGAACTTGAAAAGTTTTGAAGTAAAGAGCTTCTGTAAGATCCTG
281 N Y Y L E V N E L E K F E V K S F C K I
901 GGACCTCTATCCTACTCCAAGATCAAGCATTTGCGTTTTGGATGGCAATCGCCTCACCCAT
301 L G P L S Y S K I K H L R L D G N R L T
961 ACTAGTCTGCCACCTGATATGTATGAATGTCTACGCGTAGCAAATGAAATCACTGTTACT
321 H T S L P P D M Y E C L R V A N E I T V
1021 TAATATCAACTAATTCCAATATATATGAAGCGTATCCTGGAGCAACATTTTATGGTTATG
341 T
1081 TTTTTTTGTGTGTCAGTTTTTCATAATATTTTCATAATGTTTCATAATATTCATTTTTGTTG
1141 TTTATTACTTCCATGAATTTTAAATTCCAAGCGAAAAATGTTTTGTAAACATTTTACTACT
1201 TTTTTTAAAAAGAAAAGATGAAAGGCAGGCCTATTTTCATCACAAAGCACAGACACATACACA
1261 CACACAGACAACAACTTAACGCTGTATTTGTAAATTTAGTGTTTTCCACATCTCTACCG
1321 TCAAAATGATGTACAAAGCCTTTTACTGGTGTGTATGGAAGTCAGCCAAGTTTGTAAATCTT
1381 AATCTTAACTTAATGTGCCAAAAAGCATGGACTACATACAAATGGGTGTTTACTGCTTG
1441 AGCAAGCCATCTCAATTTTTAAATGCTCAAATTTTAAATGTTCAAATTTGTTTTGCTGAAA
1501 AATAGGTGGTAAATTTTGTAGATCAATGATTATGCAAGGTACTAGACAAAATTCATTAAGC
1561 CGCGTACACTTAAAGCAGTATTTTGTAGTATTAATAAATTCATGTAGTTACCTAGTGGAACT
1621 TTTCTTTTCTAGAATTATTTCACTCTAAGTCCCATGTATGTTTTCTTTTTGATTATTTGCA
1681 TGTTATGTTTTAACAAGCTAATAGCAAAAATAAACAATAGCAAAAGTGG

Figure 7

Séquences en acides nucléiques et aminés de lumican (LUM) équin. L'ADNc de LUM équin correspond à 1799 pb dont 72 pb sont en 5' non-codant, le cadre de lecture ouvert de 1023 pb codant pour une protéine de 341 acides aminés. La

portion 3' non-codante de 703 pb renferme un signal de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A+. Les sections utilisées pour créer les oligonucléotides ayant servies aux séquençages sont inscrites en bleu pour les oligonucléotides sens et en rouge pour les oligonucléotides anti-sens. L'ordre de la séquence en acides animés (chiffre pâle), celui de la séquence d'acides nucléiques (chiffre en gras) sont indiquées à gauche et les chiffres en gras négatifs sont des acides nucléiques en 5' non-codant.

Tableau VI Comparaison par BLAST de la séquence d'acides aminés de lumican (LUM) équin avec les séquences d'autres espèces. L'identité représente un pourcentage estimé de l'homologie des séquences d'acides aminés équines comparés à toutes celles du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) via la fonction BLAST, la valeur E représente une valeur statistique ($p = 1-e^{-E}$) et la référence est le code d'accèsion de la protéine. Les exposants de la colonne "Identité" représentent des protéine autres que LUM, soit :

1. "Similar to Lumican precursor (Keratan sulfate proteoglycan lumican, KSPG lumican)";
2. "Lumican isoform 1";
3. "Lumican precursor (Keratan sulfate proteoglycan (KSPG), Corneal keratan sulfate proteoglycan 37B core protein";
4. "Lumican isoform 2".

Espèce	Identité (%)	Valeur E	Référence
Bos taurus	87	0.0	NP_776359
	87 ³	0.0	Q05443
Canis familiaris	90 ¹	0.0	XP_539716
Homo sapiens	87	0.0	AAH35997
	87	0.0	AAP35353
	87	0.0	AAA85268
Coturnix japonica	73	8e-173	AAG48155
Papio anubis	89	3e-109	ABG77273
Oryctolagus cuniculus	91	1e-143	AAC39517
	91	1e-143	O46379
Gallus gallus	73 ¹	2e-171	XP_416135
Rattus norvegicus	83	0.0	NP_112312
Mus musculus	85	0.0	AAH05550
	85	0.0	NP_032550
Macaca mulatta	87 ⁴	0.0	XP_001102753
	88 ²	0.0	XP_001102667
Pan troglodytes	88 ⁴	0.0	XP_509260
	88 ²	0.0	XP_001135206

3.2 Expression temporelle de l'ADNc pour THBS2, SPARC et LUM lors de la guérison de plaies cutanées thoraciques, aux membres et lors de l'induction expérimentale d'un bouton de chair

Afin de réduire les coûts et le temps nécessaires à l'utilisation de la technologie "SMART", l'ARN des quatre juments pour une semaine et un groupe donné a été combiné de façon à limiter le nombre d'échantillons. Ainsi, les réplicats obtenus pour les résultats proviennent de la répétition du RT-PCR nous donnant comme statistique une variation inter-manipulation plutôt qu'inter-animale. Avec le test de "t" unilatéral apparié, il n'est pas possible de vérifier la normalité des données puisqu'il n'y a que 4 valeurs. Par contre, le test de "t" unilatéral apparié est assez robuste pour les déviations par rapport à la normalité. Ici, l'élément important c'est qu'il n'y a pas de réplications dans les individus puisque toutes les valeurs des juments ont été mises ensemble. L'erreur provenait donc des erreurs de mesures ce qui n'est pas approprié pour bien juger des différences entre les groupes. Nous seront donc très prudent dans l'interprétation des données car il n'est pas certain que les différences observées persisteraient avec la bonne méthodologie.

L'analyse de l'expression de l'ARNm de GAPDH équin ne démontre aucune différence significative dans tous les groupe tous temps confondus et à tous les temps tous groupes confondus (Figure 8).

L'analyse de l'expression de l'ARNm de THBS2 équin suivant le modèle linéaire à mesures répétées, avec le temps et le groupe comme facteurs intra-sujet, indique un effet significatif du groupe tous temps confondus ($p = 0,001$) et du temps tous groupes confondus ($p < 0,0001$). L'effet du groupe variait d'un temps à l'autre ($p < 0,0001$). Globalement, l'expression génique de THBS2 était supérieure dans les plaies thoraciques par rapport aux plaies appendiculaires avec et sans bandage. En comparant l'expression génique de THBS2 dans les plaies par rapport à la peau normale pour un même groupe (soit thorax, membre non-bandé, ou membre bandé), celle-ci est significativement plus élevée aux semaines un à quatre et six au thorax (Figure 9). Dans les plaies sur le membre non-bandé, l'expression surpasse celle présente dans la peau normale aux semaines un à quatre, tandis que dans les plaies de membre bandé, ceci ne survient qu'à la deuxième et la sixième semaine. (Figure

9). Cependant, en comparant les trois groupes à un même temps, il appert que THBS2 soit fortement exprimé au thorax par rapport aux membres, bandés ou non, aux semaines un à trois et six (Figure 9), tandis qu'elle est fortement exprimée dans les plaies de membres non-bandés comparativement à celles localisées sur des membres bandés aux semaines deux à quatre (Figure 9). Le cas inverse ne se produit qu'à la sixième semaine alors que l'expression aux membres non-bandés retourne à la valeur pré-opératoire (Figure 9).

L'analyse de l'expression de l'ARNm de SPARC suivant le modèle linéaire à mesures répétées, avec le temps et le groupe comme facteurs intra-sujet, indique un effet presque significatif du groupe tous temps confondus ($p = 0,08$) et démontre un effet significatif du temps tous groupes confondus ($p < 0,0001$). L'effet du groupe variait d'un temps à l'autre ($p = 0,008$). L'expression de l'ARNm de SPARC est persistante dans les trois groupes puisqu'elle ne diminue pas au cours de l'étude. L'analyse statistique soutient une sur-expression significative pendant toute la période de guérison par rapport à la peau normale non-lésée, et ce pour tous les groupes (Figure 10). Lors d'une comparaison entre groupes à un temps donné, l'ARNm de SPARC est fortement exprimé dans les plaies thoraciques par rapport aux plaies de membres bandés aux semaines trois et quatre, mais seulement à la troisième semaine dans les plaies thoracique par rapport aux plaies de membres sans bandage (Figure 10).

Finalement, l'analyse de l'expression de l'ARNm de LUM suivant le modèle linéaire à mesures répétées, avec le temps et le groupe comme facteurs intra-sujet, indique un effet significatif du groupe tous temps confondus ($p = 0,02$) et du temps tous groupes confondus ($p < 0,0001$). L'effet du groupe variait marginalement d'un temps à l'autre ($p = 0,05$). Sur toute la période, l'expression de l'ARNm de LUM est moins élevée dans les plaies de membre non-bandé que dans les plaies des deux autres groupes. Globalement, l'expression génique de LUM est persistante dans les trois groupes. En effet, elle ne retrouve pas les valeurs basales de peau non-lésée à l'intérieur de la période d'étude (Figure 11). L'analyse des trois groupes à un temps donné démontre que LUM est fortement exprimé dans les plaies thoraciques et celles affligeant les membres bandés par rapport à celles présentes sur des membres non-

bandées aux semaines 1 et 6 (Figure 11). De plus, l'ARNm de LUM est plus fortement exprimé dans les plaies thoraciques comparativement à celles des membres non-bandées à la semaine 3, puis dans les plaies appendiculaires bandées par rapport à celles de membres non-bandées à la semaine 4 (Figure 11).

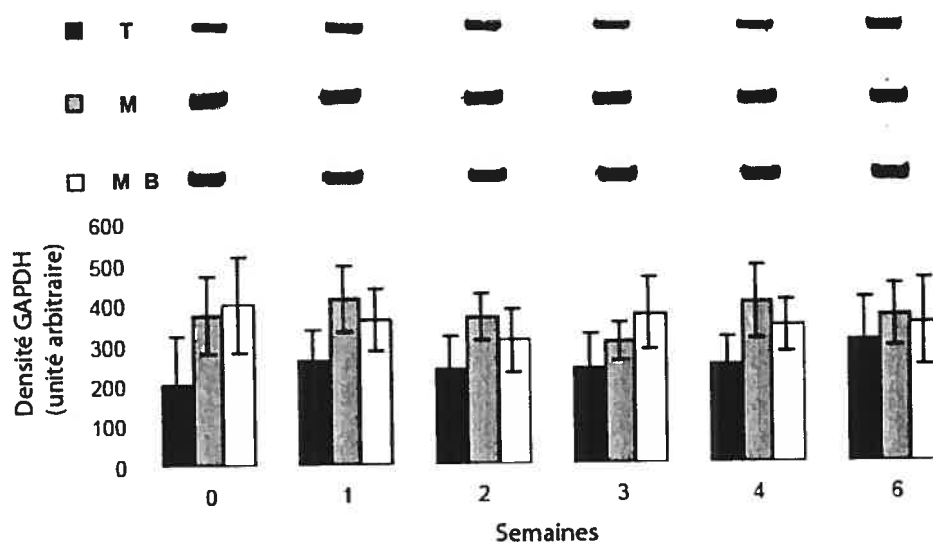


Figure 8

Analyse de l'expression en ARNm de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) équin. L'analyse des réactions de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR) a été réalisée en triplicat et les droites d'erreur indiquent l'écart-type entre les triplicats. L'abscisse de l'histogramme représente la semaine où les échantillons ont été prélevés, tandis que l'ordonnée de l'histogramme indique la densité de GAPDH équin. Les échantillons équins utilisés proviennent du thorax (T), des membres non-bandés (M) et des membres bandés (MB). Dans le haut de la figure, les fragments de GAPDH équin amplifiés par RT-PCR sont vis-à-vis leur groupe d'échantillon (T, M et MB) et la semaine du prélèvement.

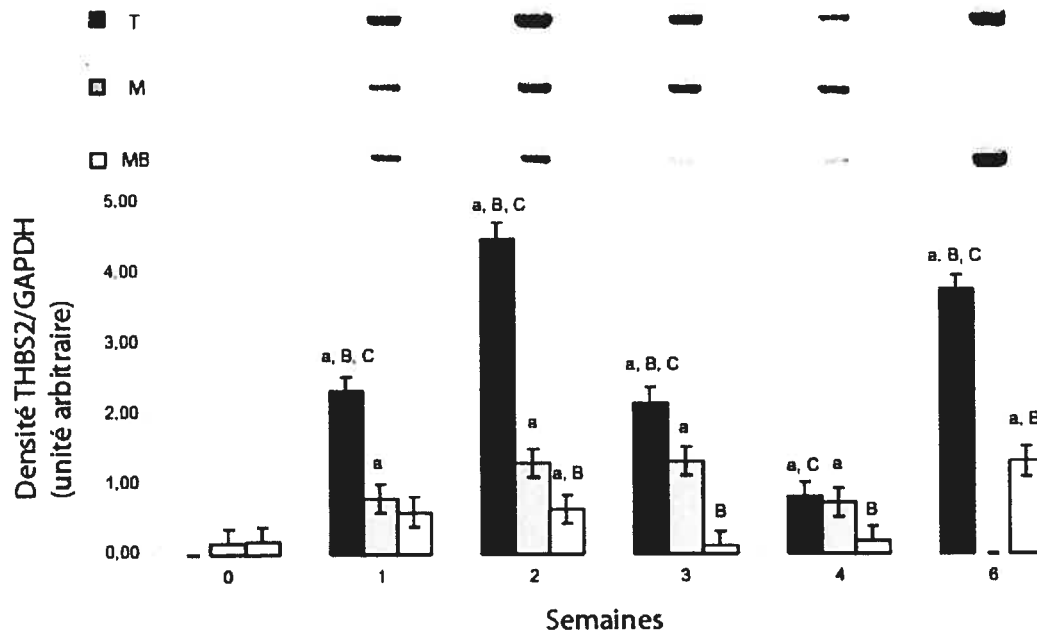


Figure 9

Analyse de l'expression en ARNm de "thrombospondin 2" (THBS2) équin. L'analyse des réactions de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR) a été réalisée en triplicat et les droites d'erreur indiquent l'écart-type entre les triplicats. L'abscisse de l'histogramme représente la semaine où les échantillons ont été prélevés, tandis que l'ordonnée de l'histogramme indique la densité de THBS2 équin qui a été normalisée avec les valeurs de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) équin. La lettre "a", au-dessus des colonnes de l'histogramme indique une différence significative du triplicat par rapport à la semaine 0 du même groupe. La lettre "B", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres non-bandés au même temps. La lettre "C", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres bandés au même temps. Les échantillons équins utilisés proviennent du thorax (T), des membres non-bandés (M) et des membres bandés (MB). Dans le haut de la figure, les fragments de THBS2 équin amplifiés par RT-PCR sont vis-à-vis leur groupe d'échantillon (T, M et MB) et la semaine du prélèvement.

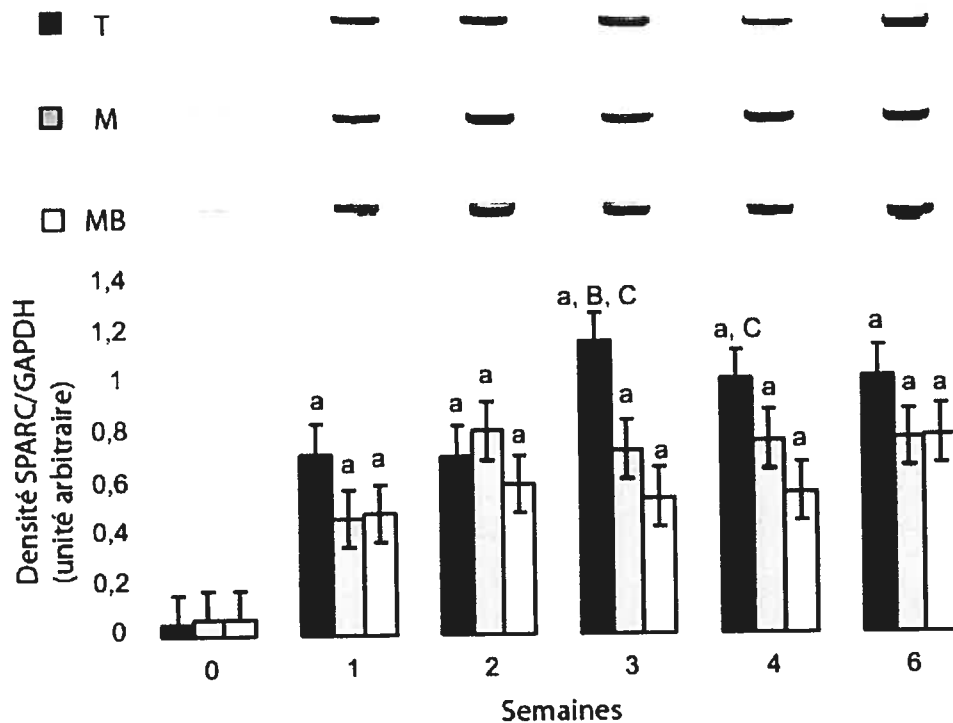


Figure 10

Analyse de l'expression en ARNm de "Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine" (SPARC) équin. L'analyse des réactions de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR) a été réalisée en triplicat et les droites d'erreur indiquent l'écart-type entre les triplicats. L'abscisse de l'histogramme représente la semaine où les échantillons ont été prélevés, tandis que l'ordonnée de l'histogramme indique la densité de SPARC équin qui a été normalisée avec les valeurs de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) équin. La lettre "a", au-dessus des colonnes de l'histogramme indique une différence significative du triplicat par rapport à la semaine 0 du même groupe. La lettre "B", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres non-bandés au même temps. La lettre "C", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres bandés au même temps. Les échantillons équins utilisés proviennent du thorax (T), des membres non-bandés (M) et des membres bandés (MB). Dans le haut de la figure, les fragments de SPARC équin amplifiés par RT-PCR sont vis-à-vis leur groupe d'échantillon (T, M et MB) et la semaine du prélèvement.

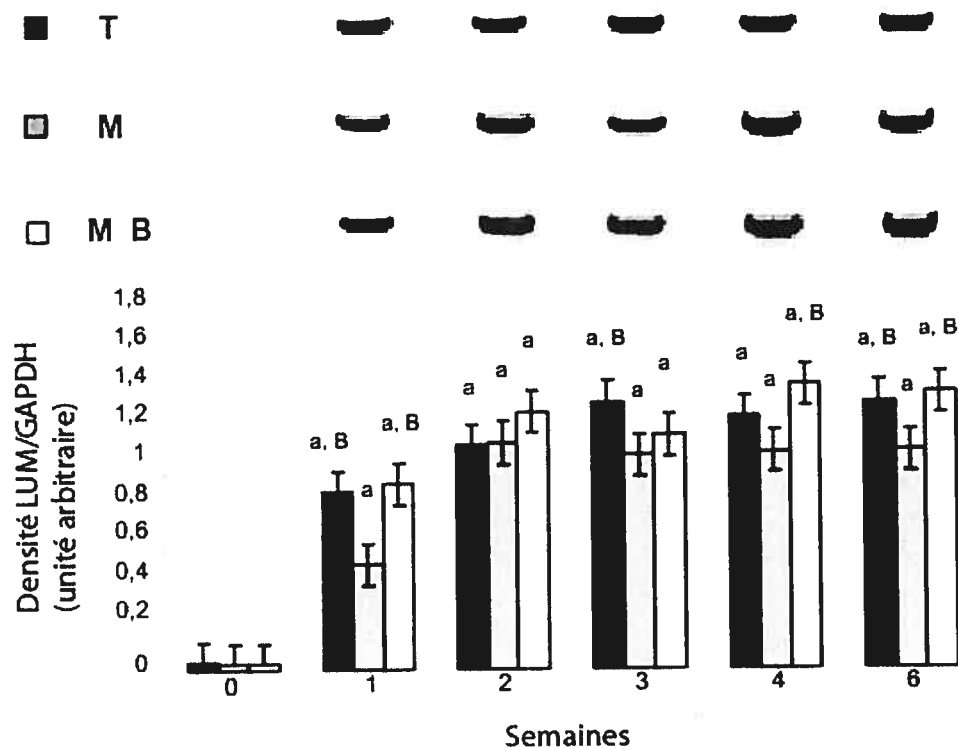


Figure 11

Analyse de l'expression en ARNm de lumican (LUM) équin. L'analyse des réactions de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR) a été réalisée en triplicat et les droites d'erreur indiquent l'écart-type entre les triplicats. L'abscisse de l'histogramme représente la semaine où les échantillons ont été prélevés, tandis que l'ordonnée de l'histogramme indique la densité de LUM équin qui a été normalisée avec les valeurs de "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase" (GAPDH) équin. La lettre "a", au-dessus des colonnes de l'histogramme indique une différence significative du triplicat par rapport à la semaine 0 du même groupe. La lettre "B", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres non-bandés au même temps. La lettre "C", au-dessus des colonnes de l'histogramme, indique une différence significative du triplicat du groupe donné par rapport aux membres bandés au même temps. Les échantillons équins utilisés proviennent du thorax (T), des membres non-bandés (M) et des membres bandés (MB). Dans le haut de la figure, les fragments de LUM équin amplifiés par RT-PCR sont vis-à-vis leur groupe d'échantillon (T, M et MB) et la semaine du prélèvement.

4 Discussion

Cette étude est pionnière puisqu'elle procure la caractérisation partielle et complète de trois gènes contribuant à la guérison cutanée chez le cheval, soit THBS2, SPARC et LUM. Elle a ainsi permis de constater une forte homologie entre la séquence d'acides aminés de SPARC équin et celle des autres espèces. De plus, elle a permis de discerner les tendances à la sous-expression de THBS2 dans les plaies des membres bandés, simulant la cicatrisation pathologique, par rapport aux plaies thoraciques, représentant la réparation normale. Cette étude révèle aussi une persistance dans l'expression des transcrits de LUM et de SPARC au cours de la réparation de la peau équine.

La fibroplasie excessive survenant lors de guérison cutanée chez le cheval représente une forme de cicatrisation pathologique. C'est un problème fréquent et qui requiert des soins onéreux. L'élucidation de la physiopathologie de cette condition pourrait inspirer des approches thérapeutiques novatrices visant à prévenir et/ou guérir la fibrose du derme chez le cheval, et éventuellement la fibroprolifération d'autres organes chez diverses espèces animales. Pour ce faire, il faut initialement mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la guérison cutanée normale. L'objectif à long terme de cette recherche est de peaufiner notre connaissance du contrôle génique de la guérison chez le cheval et, plus étroitement, d'établir la corrélation entre l'expression d'ARNm de diverses molécules et l'expression spatio-temporelle de leurs protéines tissulaires.

La fibroplasie est le mécanisme par lequel les fibroblastes reconstituent le tissu conjonctif lésé en synthétisant des nouveaux éléments de la MEC. Une fois que la MEC est reconstruite, certains fibroblastes équipés de fibrilles d'actine, se mettent en mode de contraction et contribuent à la fermeture de la plaie. Aussi, les MMP modifient le contenu provisoire synthétisé par les fibroblastes, ce qui a pour effet d'augmenter la force de la cicatrice lors de sa maturation durant les semaines et les mois qui suivent. Autrement dit, plusieurs phases se chevauchent durant la guérison de plaies. Les gènes de LUM, de THBS2 et de SPARC ont été choisis puisqu'ils auraient des actions au cours de la phase proliférative ainsi que durant le remodelage.

La technique de Chomczynski et Sacchi (1987) procure d'excellentes conditions pour extraire l'ARN difficile à obtenir en raison de la rigidité de la peau de cheval, particularité qui complique en effet l'homogénéisation des molécules biologiques sans les détruire. De plus, il faut inhiber les ribonucléases (RNase) pour prévenir qu'ils ne dégradent l'ARN de l'échantillon, tout en évitant d'en rajouter depuis l'environnement externe (salive, équipement non stérile, contact de la peau, etc ...). Le kit SMART (BD Bioscience) a été choisi puisque la quantité d'ARN extraite est très faible. En effet, cet ensemble permet d'amplifier le peu d'ARN total résultant de l'extraction, tout en soutenant la transcription de long brin requise pour les applications de "Northern" virtuel et de création de mini-génothèque d'ADNc. Le "Northern" virtuel utilise des échantillons l'ADNc plutôt que d'ARN total ou messager, un atout significatif en raison de la fragilité de cette dernière molécule vis-à-vis des RNase. De plus, cette technique renseigne sur le poids moléculaire du transcrit, ce qui facilite son isolement. La connaissance du poids moléculaire du transcrit favorise de plus le clonage de l'ADNc via la réplication des plasmides et des bactéries dans une grandeur ciblée d'ADNc. La détection des clones se fait par la couleur de la colonie puisque le transcrit infiltré dans le plasmide empêche l'expression du peptide α LacZ.

La séquence de la partie codante d'ADNc de la THBS2 n'a pas été complètement déduite. Le transcrit partiel de THBS2 équin correspond à 4613 pb avec un cadre de lecture ouvert partiel de 2543 pb qui coderait pour une protéine d'environ 846 acides aminés (figure 5). Il manquerait donc environ 1 kb du côté 5' pour obtenir la partie codante complète. Il semblerait que plus nous nous approchons de l'extrémité 5' de la partie codante chez l'équin, plus la séquence d'acides nucléiques serait concentrée en GC. D'ailleurs, au cours des manipulations, il devenait extrêmement compliqué de trouver une région propice à ce qu'un oligonucléotide puisse poursuivre le séquençage, dû à cette forte présence de GC. L'utilisation de la technique d'amplification rapide des extrémités 5' de l'ADNc (5' RACE) pourrait possiblement remédier à cet obstacle. En revanche, la caractérisation de l'ARNm de LUM et de SPARC est complète. L'ADNc de LUM équin est constitué de 1799 pb dont 72 pb sont dans la région 5' non-codante, il

possède un cadre de lecture ouvert de 1023 pb qui coderait pour une protéine d'environ 341 acides aminés (figure 7) et il possède une identité élevée par rapport à la séquence d'acides aminés des autres espèces (Tableau VI). Pour sa part, l'ADNc de SPARC équin correspond à 2148 pb dont 35 pb en 5' non-codant, et possède un cadre de lecture ouvert de 914 pb qui coderait pour une protéine d'environ 303 acides aminés (figure 6). Il présente une identité élevée avec la séquence d'acides aminés des autres espèces (Tableau V). L'analyse des résultats de l'expression temporelle de l'ARNm de THBS2 se fait plus aisément sur deux temps : soit la phase précoce (jusqu'à la troisième semaine) puis la phase tardive (semaines quatre à six) de la guérison. Une inhibition de l'angiogénèse représente vraisemblablement le rôle prépondérant de THBS2 (Streit et *al.*, 1999). En effet, une étude menée sur des souris THBS2^{-/-} suggère qu'il existe une association entre une absence de THBS2 et un accroissement de l'angiogénèse durant les phases précoces de la guérison (Kyriakides et *al.*, 1999b). Les résultats de notre étude corrélaient bien avec cette conclusion puisque les plaies appendiculaires chez le cheval, qui affichaient un taux niveau d'expression d'ARNm de THBS2 aux semaines un à trois comparativement aux plaies du tronc (figure 9), démontrent un plus grand nombre de vaisseaux sanguins et plus de tissu de granulation durant la phase proliférative, par rapport à leur pendant thoracique (Lepault et *al.*, 2005). Selon ces derniers auteurs, un processus apoptotique modifié pourraient expliquer la formation excessive de tissu de granulation dans les plaies appendiculaires chez le cheval. À cet effet, il est intéressant de noter que la capacité de THBS2 à promouvoir la régression vasculaire semble reposer sur une induction de l'apoptose des cellules endothéliales dans les plaies en guérison (Jimenez et *al.*, 2000; Noh et *al.*, 2003). À cet effet, un taux inférieur de THBS2 dans les plaies du membre pourrait être lié au défaut de régression des vaisseaux sanguins à cet endroit. Cependant, le modèle expérimental de la présente étude ne permet pas de conclure à un effet causal de THBS2. Il est possible que sa faible expression dans les plaies du membre ne soit que la manifestation d'une angiogénèse accrue à cet emplacement.

THBS2, sécrété principalement par le fibroblaste de la plaie, se lie à la forme latente du TGFβ1, inhibant ainsi son activation par THBS1 (Schultz-Cherry et *al.*,

1995). Le maintien d'une faible expression relative de THBS2, que nous avons mesurée dans les plaies appendiculaires jusqu'à six semaines suivant l'injure (figure 9), présage une persistance de la concentration de TGFB1 à cet emplacement, ce qui a été confirmé par Theoret et coll. (2001).

Les fibroblastes dermiques de souris THBS2^{-/-} souffrent d'un défaut d'adhésion et de migration sur de nombreuses protéines de la MEC, possiblement en raison d'une séquestration de la MMP-2 par la THBS2 (Yang et *al.*, 2000). Ce défaut d'adhésion semble provoquer une inaptitude, de la part des fibroblastes dermiques, à contracter des gels de collagène (Kyriakides et *al.*, 1999a). Or, il a récemment été démontré par Wilmink et coll. (1999a) que les plaies appendiculaires chez le cheval souffrent d'une mauvaise contraction par rapport aux plaies du tronc. Il est donc tentant de proposer une relation entre les faibles taux d'expression d'ARNm de THBS2 retrouvés dans les plaies du membre durant la phase tardive de la guérison (notamment aux membres bandés de la quatrième semaine) et la piètre contraction les caractérisant (figure 9). À l'opposé, l'amplification de l'expression notée à quatre semaines dans les plaies thoraciques pourrait signaler l'excellente contraction de plaie survenant à cet endroit (figure 9).

Un phénomène qui demeure difficile à expliquer est la différence significative dans l'expression de THBS2 entre les plaies des membres non-bandés et celles retrouvées sous un bandage, à six semaines (figure 9). En effet, nous nous serions attendus à ce que le taux d'expression soit supérieur pour les plaies non-bandées qui guérissent mieux que celles sous bandage (Lepault et *al.*, 2005). Ceci pourrait refléter la réalité ou être lié à la technique de lecture utilisée. Nous tentons à présent de vérifier ces données à l'aide d'études à caractère protéique.

SPARC n'est pas constitutivement exprimée puisqu'en tant que protéine matricielle elle est présente exclusivement dans les tissus subissant un remodelage (Brekken et Sage, 2001). L'expression génique temporelle mesurée par cette étude montre en effet une quasi-absence de l'ARNm pour SPARC dans la peau non-lésée, que ce soit aux thorax ou aux membres (figure 10).

Il a été assigné à SPARC un rôle "d'organisateur de la matrice" lors de la guérison vue que la protéine se lie à certaines composantes de la MEC, en particulier

le collagène (Brekken et Sage, 2001). Ainsi, SPARC favorise la production d'une MEC plus permissive à la migration, la prolifération et la différenciation, en outre, des cellules inflammatoires (Goldblum et *al.*, 1994; Brekken et *al.*, 2003). Cette action de la protéine ne concorde pas entièrement avec nos résultats puisque selon la littérature, qui démontre une réponse inflammatoire inadéquate dans les plaies appendiculaires du cheval (Wilmink et *al.*, 1999b; Wilmink et *al.*, 2003), il serait attendu que l'expression de SPARC soit supérieure dans les plaies thoraciques en phase aiguë. Or, ceci n'est survenu qu'à la troisième et quatrième semaines de guérison (figure 10). La cinétique différentielle à ce moment qui correspond à la phase proliférative de la guérison, pourrait cependant expliquer les retards d'épithélialisation et de contraction dont souffrent les plaies situées aux membres chez le cheval (Jacobs et *al.*, 1984; Theoret et *al.*, 2002; Wilmink et *al.*, 1999a). En soutien à cette hypothèse, Basu et coll. (2001) ont montré un délai de fermeture d'une grande plaie chez des souris SPARC^{-/-} (Basu et *al.*, 2001). Malgré que ce retard fut attribué à un défaut de migration des fibroblastes plutôt qu'à un défaut de contraction ou d'épithélialisation, il est tout à fait plausible que le rôle de SPARC dans la prolifération cellulaire dépende du type et de l'environnement cellulaire, tel que suggéré par Basu et coll. (2001).

Par ailleurs, on attribue à SPARC le rôle de modulateur de l'activité cytokinique. SPARC, en se liant à certains facteurs de croissance dont le FGF2, le PDGF et le VEGF supprimerait leur potentiel mitogène (Brekken et Sage, 2001). Cette capacité pourrait expliquer comment la moindre présence de SPARC dans les plaies de membre peut favoriser l'angiogénèse et la fibroplasie à cet endroit. Or, une étude récente suggère que SPARC possède la capacité de stimuler la signalisation de TGFB par l'entremise de la voie dépendante du Smad2/3 (Schiemann et *al.*, 2003). Une forte expression de SPARC a d'ailleurs été signalée lors de divers désordres fibrotiques incluant la fibrose pulmonaire, la fibrose interstitielle du rein, la cirrhose hépatique, ainsi que le scléroderme/sclérose systémique (Kuhn et Mason, 1995; Pichler et *al.*, 1996; Frizell et *al.*, 1995; Dhore et *al.*, 2001; Zhou et *al.*, 2002). En corollaire, il serait attendu une expression supérieure de SPARC dans les plaies

appendiculaires, en particulier celles souffrant de fibroplasie excessive, qui, de surcroît expriment davantage de TGFB1 (Theoret et *al.*, 2001).

En conclusion, l'effet de SPARC et de THBS2 sur la guérison des plaies semble complexe puisque plus d'un rôle peut être assigné à ces protéines. Notamment, SPARC favoriserait la migration cellulaire mais contrôlerait de plus l'activité cytokinique, tandis que THBS2 aurait un rôle anti-angiogénique ainsi qu'un effet sur l'activité des MMP et possiblement sur celle de TGFB1. Ce fait complique l'interprétation de leur expression génique et pourrait expliquer le patron inattendu retrouvé dans les plaies appendiculaires. Des analyses immunohistochimiques sont présentement en cours afin de préciser la localisation de chaque protéine lors des différentes étapes de guérison dans l'espoir de mieux définir leur action.

Nous avons trouvé un effet significatif du temps, tous groupes confondus, en ce qui concerne l'expression génique de LUM (figure 11). Boykiw et coll. (1998) ont rapporté un accroissement des concentrations d'ARNm de LUM à trois, six et quatorze semaines de guérison ligamentaire chez le lapin. Ces augmentations étaient significatives à trois et six semaines comparativement à des tissus non-lésés, mais plus à 14 semaines. Bien que notre étude ait été de plus courte durée, nos résultats concordent parfaitement avec ceux décrits par Boykiw. De plus, LUM est non seulement exprimé dans la majorité des tissus en raison de son interaction avec le collagène, mais il aurait une influence lors des trois phases de guérison, soit : la phase inflammatoire (Vij et *al.*, 2005), proliférative (Saika et *al.*, 2002) et de remodelage (Yeh et *al.*, 2005).

Nos résultats affichent de plus un effet significatif du groupe, l'expression de l'ARNm de LUM étant moins élevée dans le groupe des membres non-bandés que dans les deux autres, sur toute la période (figure 11). LUM favoriserait l'adhésion et/ou la migration cellulaires par l'entremise d'interactions avec les récepteurs d'intégrines, notamment localisés aux macrophages et aux neutrophiles, lors de la réponse inflammatoire. En effet, Vij et coll. (2005) pensent qu'une absence de LUM serait responsable du recrutement monocytaire déficient ainsi que du manque d'induction de cytokines pro-inflammatoires notés chez les souris LUM^{-/-}. De plus,

LUM augmenterait la prolifération cellulaire (Saika et *al.*, 2002; Yeh et *al.*, 2005), favorisant par le fait même la fibroplasie, l'angiogénèse et l'épithélialisation. Il est donc aisé d'interpréter la cinétique d'expression génique de LUM dans les plaies thoraciques par rapport aux plaies du membre non-bandé à la première semaine (phase inflammatoire) ainsi qu'à la troisième semaine (phase proliférative) (figure 11). Cependant, le profil de l'expression génique dans les plaies de membre bandé est difficilement explicable car on s'attendait à ce qu'il ressemble davantage à celui exhibé par les plaies de membre non-bandé. Il est possible que l'expression plus grande notée à la quatrième et à la sixième semaines dans les plaies bandées (figure 11) corrèle avec l'inflammation chronique et la présence excessive de tissu de granulation à cet endroit par rapport à ce qui survient dans les plaies appendiculaires non-bandées (Lepault et *al.*, 2005). Toutefois, cette différence devrait être encore plus significative aux plaies thoraciques chez qui l'inflammation est résolue à la sixième semaine et qui ne démontrent quasi jamais de bouton de chair. Il serait certainement intéressant de mesurer l'expression génique au-delà de la sixième semaine puisque la guérison aux membres n'est pas tout à fait complète à ce temps. En effet, des échantillons de bord de plaie furent prélevés jusqu'à la sixième semaine suivant leur création, prétextant que la guérison serait terminée une fois la plaie complètement épithélialisée. Par contre, Lepault et coll. (2005) ont remarqué qu'à la sixième semaine, l'inflammation n'est complètement résolue que dans les plaies thoraciques. De plus, l'angiogénèse persiste dans les trois groupes à ce temps, indiquant que malgré une apparence macroscopiquement normale, le processus de guérison demeure inachevé.

Au cours de ce projet, les gènes séquencés et les séquences d'acides aminés démontrent des différences significatives ou non par rapport aux autres espèces. Il serait ainsi intéressant de vérifier si ces différences ont une importance du point de vue biologique. Par exemple, il est intéressant de noter que malgré l'absence d'exons de SPARC chez *C. elegans* par rapport au SPARC des mammifères, aucun changement aux fonctions biologiques n'est rapporté (Schwarzbauer et *al.*, 1994; Maurer et *al.*, 1997).

5 Conclusion

La caractérisation de l'ADNc complet a été déterminée pour SPARC et LUM équin, tandis qu'elle demeure partielle pour THBS2 puisque le séquençage de la partie codante du gène en extrémité 5'est concentrée en G et C, compliquant la caractérisation. À cet effet, l'utilisation d'une technique tel que le 5'RACE permettrait possiblement de finaliser la caractérisation de l'extrémité 5' de l'ADNc de THBS2.

L'analyse de l'expression temporelle des trois gènes a été effectuée pour les ARNm correspondant. Il a permis de constater que ces gènes ont des patrons d'expression leur étant spécifique. Des recherches sur l'expression protéique sont présentement en cours dans le but de corroborer et expliciter nos données géniques. Cependant, la présence d'inflammation et d'angiogénèse persistant à la fin de l'étude démontre qu'il faudrait prolonger la période d'observation afin de s'assurer que le processus de guérison soit terminé.

Le but ultime auquel contribue cette étude est de développer une stratégie thérapeutique cellulaire ou moléculaire pouvant prévenir ou traiter la cicatrisation pathologique chez le cheval.

6 Bibliographie

- ADOLPH, KW. 1999. Detection of exon skipping and retained introns in transcription of the human thrombospondin 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **259**(3):527-32.
- AGAH, A., KYRIAKIDES, T. R., LAWLER, J., BORNSTEIN, P. 2002. The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice. *Am J Pathol.* **161**(3):831-839.
- ANTONSON, P., HEINEGÅRD, D., OLDBERG, Å. 1993. Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene. *Biochim Biophys Acta.* **1174**(2):204-206.
- BAENZIGER, N. L., BRODIE, G. N., MAJERUS, P. W. 1971. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Nat Acad Sci.* **68**: 240-243.
- BARBER, S. M. 1990. Second intention wound healing in the horse: The effect of bandages and topical corticosteroids. *Proc. Am. Assoc. Equine Practnr* **35**:107-116.
- BASU, A., KLIGMAN, L. H., SAMULEWICZ, S. J., HOWE, C. C. 2001. Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol.* **2**:15.
- BASSUK, J. A., GRADY, R., MITCHELL, M. 2000. Review article: The molecular era of bladder research. Transgenic mice as experimental tools in the study of outlet obstruction. *J Urol* **164**:170-179.
- BOERMA, M., BURTON, G. R., WANG, J., FINK, L. M., McGEHEE, R. E., HAUER-JENSEN, M. 2006. Comparative expression profiling in primary and immortalized endothelial cells: changes in gene expression in response to hydroxy methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **17**(3):173-180.
- BORNSTEIN, P. 1992. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* **6**(14):3290-3299.
- BORNSTEIN, P. 1995. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol.* **130**(3):503-506.
- BORNSTEIN, P., SAGE, E. H. 2002. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* **14**(5):608-616.
- BORNSTEIN, P., ALFI, D., DEVARAYALU, S., FRAMSON, P., LI, P. 1990. Characterization of the mouse thrombospondin gene and evaluation of the role of the first intron in human gene expression. *J Biol Chem.* **265**(27):16691-16698.
- BORNSTEIN, P., DEVARAYALU, S., LI, P., DISTECHE, C. M., FRAMSON, P. 1991. A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum. *Proc Nat Acad Sci.* **88**:8636-8640.
- BORNSTEIN, P., KYRIAKIDES, T. R., YANG, Z., ARMSTRONG, L.C., BIRK, D. E. 2000. Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **5**(1):61-66.

- BOYKIW, R., SCIORE, P., RENO, C., MARCHUK, L., FRANK, C. B., HART, D. A. 1998. Altered levels of extracellular matrix molecule mRNA in healing rabbit ligaments. *Matrix Biol.* **17**(5):371-378.
- BRADSHAW, A. D., SAGE, E. H. 2001. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.* **107**(9):1049-1054.
- BRADSHAW, A. D., REED, M. J., SAGE, E. H. 2002. SPARC-null mice exhibit accelerated cutaneous wound closure. *J Histochem Cytochem.* **50**(1):1-10.
- BRADSHAW, A. D., GRAVES, D. C., MOTAMED, K., SAGE, E. H. 2003. SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**: 6045-6050.
- BREKKEN, R. A., SAGE, E. H. 2000. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* **19**(7):569-580.
- BREKKEN, R. A., SAGE, E. H. 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* **19**(8):816-827.
- BREKKEN, R. A., PUOLAKKAINEN, P., GRAVES, D. C., WORKMAN, G., LUBKIN, S. R., SAGE, E. H. 2003. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest.* **111**(4):487-495.
- CHAKRAVARTI, S., MAGNUSON, T. 1995. Localization of mouse lumican (keratan sulfate proteoglycan) to distal chromosome 10. *Mamm Genome.* **6**(5):367-368.
- CHEDID, M., RUBIN, J. S., CSAKY, K. G., AARONSON, S. A. 1994. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem.* **269**(14):10753-10757.
- CHEN, H., SCOTTILE, J., O'ROURKE, K. M., DIXIT, V. M., MOSHER, D. F. 1994. Properties of recombinant mouse thrombospondin 2 expressed in Spodoptera cells. *J Biol Chem.* **269**(51):32226-32232.
- CHEN, H., STRICKLAND, D. K., MOSHER, D. F. 1996. Metabolism of thrombospondin 2. Binding and degradation by 3t3 cells and glycosaminoglycan-variant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* **271**(27):15993-15999.
- CHEN, W., FU, X. B., GE, S. L., SUN, T. Z., SHENG, Z. Y. 2006. Analysis of differentially expressed genes in fetal skin of scarless and scar-forming periods of gestational rats. *Chin J Traumatol.* **9**(2):94-99.
- CHODON, T., SUGIHARA, T., IGAWA, H. H., FUNAYAMA, E., FURUKAWA, H. 2000. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol.* **157**(5):1661-1669.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**(1):156-9.
- CHUN, Y. H., YAMAKOSHI, Y., KIM, J. W., IWATA, T., HU, J. C., SIMMER, J. P. 2006. Porcine SPARC: isolation from dentin, cDNA sequence, and computer model. *Eur J Oral Sci.* **114** Suppl 1:78-85; discussion 93-95, 379-380.

- CHVAPIL, M., PFISTER, T., ESCALADA, S., LUDWIG, J., PEACOCK Jr., E. E. 1979. Dynamics of the healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. *Exp. Mol. Pathol.* **30**:349-359.
- CLARK, R. A. F. 1996. The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd edition. *Éditeur*: R. A. F. Clark. Plenum Press, N.Y.
- COCHRANE, C. A. 1997. Models *in vivo* of wound healing in the horse and the role of growth factors. *Vet Dermatol.* **8**:259-272.
- COLE, J., TSOU, R., WALLACE, K., GIBRAN, N., ISIK, F. 2001. Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays. *Wound Repair Regen.* **9**(5):360-370.
- De MARTIN, I., THEORET, C. 2002. Particularité de la guérison cutanée chez le cheval : Rôle de facteur de croissance transformant-beta. *Dans Le médecin vétérinaire du Québec.* **32**(2):75-76.
- DANIELSON, K. C., FAZZIO, A., COHEN, I., CANNIZZARO, I. A., EICHSTETTER, I., IOZZO, R. V. 1993. The human decorin gene: intron exon organization, mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics.* **15**(1):146-160.
- DAWSON, D. W., PEARCE, S. F., ZHONG, R., SILVERSTEIN, R. L., FRAZIER, W. A., BOUCK, N. P. 1997. CD36 mediates the *In vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol.* **138**(3):707-717.
- DELOSTRINOS, C. F., HUDSON, A. E., FENG, W. C., KOSMAN, J., BASSUK, J. A. 2006. The C-terminal Ca²⁺-binding domain of SPARC confers anti-spreading activity to human urothelial cells. *J Cell Physiol.* **206**(1):211-220.
- DESMOULIÈRE, A., REDARD, M., DARBY, I., GABBIANI, G. 1995. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* **146**:56-66.
- DHORE, C. R., CLEUTJENS, J. P., LUTGENS, E., CLEUTJENS, K. B., GEUSENS, P. P., KITSLAAR, P. J., TORDOIR, J. H., SPRONK, H. M., VERMEER, C., DAEMEN, M. J. 2001. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **21**(12): 1998-2003.
- DiPIETRO, L. A. 1997. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. *EXS.* **79**:295-314.
- DUBUC, V., LEPAULT, E., THEORET, C. L. 2006. Endothelial cell hypertrophy is associated with microvascular occlusion in horse wounds. *Can J Vet Res.* **70**(3):206-210.
- EZURA, Y., CHAKRAVARTI, S., OLDBERG, A., CHERVONEVA, I., BIRK, D. E. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol.* **151**(4):779-788.
- FALANGA, V., ZHOU, L., YUFIT, T. 2002. Low oxygen tension stimulates collagen synthesis and COL1A1 transcription through the action of TGF-beta1. *Journal of Cellular Physiology.* **191**(1):42-50.
- FRAZIER, W. A. 1991. Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol.* **3**(5):792-799.

- FRIZELL, E., LIU, S. L., ABRAHAM, A., OSAKI, I., EGHBALI, M., SAGE, E. H., ZERN, M. A. 1995. Expression of SPARC in normal and fibrotic livers. *Hepatology*. **21**(3):847-854.
- FUNK, S. E., SAGE, E. H. 1993. Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*. **154**(1):53-63.
- GABBIANI, G., HIRSCHL, B. J., RYAN, G. B., STATKOV, P. R., MAJNO, G. 1972. Granulation tissue as a contractile organ. *J. Exp. Med.* **135**:719-734.
- GOLDBLUM, S. E., DING, X., FUNK, S. E., SAGE, E. H. 1994. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(8):3448-3452.
- GROVER, J., CHEN, X. N., KORENHERG, J. R., ROUGHLEY, P. J. 1995. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Bio Chem*. **270**(37):21942-21949.
- GREENHALGH, D. G. 1998. The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. **30**(9):1019-1030.
- GRINNELL, F., ZHU, M., CARLSON, M. A., ABRAMS, J. M. 1999. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res*. **248**(2):608-619.
- HAKKINEN, L., WESTERMARCK, J., KAHARI, V. M., LARJAVA, H. 1996. Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res*. **75**(10):1767-1778.
- HOGG, P. J., HOTCHKISS, K. A., JIMENEZ, B. M., STATHAKIS, P., CHESTERMAN, C. N. 1997. Interaction of platelet-derived growth factor with thrombospondin 1. *Biochem J*. **326**(Pt 3):709-716.
- HOHENESTER, E., MAURER, P., HOHENADL, C., TIMPL, R., JANSONIUS, J. N., ENGEL, J. 1996. Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nat Struct Biol*. **3**(1):67-73.
- HOHENESTER, E., MAURER, P., TIMPL, R. 1997. Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J*. **16**(13):3778-3786.
- HUDSON, A. E., FENG, W. C., DELOSTRINOS, C. F., CARMEAN, N., BASSUK, J. A. 2005. Spreading of embryologically distinct urothelial cells is inhibited by SPARC. *J Cell Physiol*. **202**(2):453-463.
- ILAN, N., MAHOOTI, S., MADRI, J. A. 1998. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis. *J. Cell. Sci.* **111**:3621-3631.
- IOZZO, R. V., MURDOCH, A. D. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J*. **10**(5):598-614.
- IRUELA-ARISPE, M.L., LISKA, D.J., SAGE, E.H., BORNSTEIN, P. 1993. Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev. Dyn.* **197**, 40-56.
- IRUELA-ARISPE, M. L., LANE, T. F., REDMOND, D., REILLY, M., BOLENDER, R.P., KAVANAGH, T. J., SAGE, E. H. 1995. Expression of

- SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*. *Mol Biol Cell*. **6**(3):327-343.
- JACOBS, K. A., LEACH, D. H., FRETZ, P. B., TOWNSEND, H. G. G. 1984 Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body horses. *Vet. Surg*. **13**(2):83-90.
- JELASKA, A., KORN, J. H. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. **43**(10):2230-2239.
- JIMENEZ, B., VOLPERT, O. V., CRAWFORD, S. E., FEBBRAIO, M., SILVERSTEIN, R. L., BOUCK, N. 2000. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*. **6**(1):41-48.
- KOBE, B., DEISENHOFER, J. 1994. The leucine rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci*. **19**(10):415-421.
- KUHN, C., MASON, R. J. 1995. Immunolocalization of SPARC, tenascin, and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. **147**(6):1759-1769.
- KUPPRION, C., MOTAMED, K., SAGE, E. H. 1998. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. **273**(45):29635-29640.
- KYRIAKIDES, T. R., BORNSTEIN, P. 2003. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost*. **90**(6):986-992.
- KYRIAKIDES, T. R., ZHU, Y. H., SMITH, L. T., BAIN, S. D., YANG, Z., LIN, M. T., DANIELSON, K. G., IOZZO, R. V., LaMARCA, M., McKINNEY, C. E., GINNS, E. I., BORNSTEIN, P. 1998. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol*. **140**(2):419-430.
- KYRIAKIDES, T. R., LEACH, K. J., HOFFMAN, A. S., RATNER, B. D., BORNSTEIN, P. 1999a. Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin 2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(8):4449-4454.
- KYRIAKIDES, T. R., TAM, J. W., BORNSTEIN, P. 1999b. Accelerated wound healing in mice with a disruption of the thrombospondin 2 gene. *J Invest Dermatol*. **113**(5):782-787.
- LaBELL, T. L., MILEWICZ, D. J., DISTECHE, C. M., BYERS, P. H. 1992. Thrombospondin II: partial cDNA sequence, chromosome location, and expression of a second member of the thrombospondin gene family in humans. *Genomics*. **12**(3):421-9.
- Le BEAU, M. M., ESPINOSA III, R., NEUMANN, W. L., STOCK, W., ROULSTON, D., LARSON, R. A., KEINANEN, M., WESTBROOK, C. A. 1993. Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **90**: 5484-5488.
- LePOOLE, I. C., BOYCE, S. T. 1999. Keratinocytes suppress TGF-b1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes. *Br J Dermatol*. **140**(3):409-416.

- LADIN, D. A., HOU, J. W., PATEL, D., MCPHAIL, M., OLSON, J. C. SAED, G. M., FIVERSON, D. P. 1998. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Rep and Reg* **6**:28-37.
- LAFEUILLADE, B., PELLERIN, S., KERAMIDAS, M., DANIK, M., CHAMBAZ, E. M., FEIGE, J. J. 1996. Opposite regulation of thrombospondin-1 and corticotropin-induced secreted protein/thrombospondin-2 expression by adrenocorticotrophic hormone in adrenocortical cells. *J Cell Physiol.* **167**(1):164-172.
- LANE, T. F., SAGE, E. H. 1994. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* **8**(2):163-173.
- LANE, T. F., IRUELA-ARISPE, M. L., JOHNSON, R. S., SAGE, E. H. 1994. SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol.* **125**(4):929-943.
- LAWLER, J., DUQUETTE, M., FERRO, P., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. 1991. Characterization of the murine thrombospondin gene. *Genomics.* **11**(3):587-600.
- LEFEBVRE-LAVOIE, J., LUSSIER, J. G., THEORET, C. L. 2005. Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. *Physiol Genomics.* **22**(2):157-170.
- LEPAULT, E., CELESTE, C., DORE, M., MARTINEAU, D., THEORET, C. L. 2005. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen.* **13**(5):520-529.
- LEVESQUE, V., FAYAD, T., NDIAYE, K., NAHE DIOUF, M., LUSSIER, J. G. 2003. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* **35**: 72-78.
- LISKA, D. J., HAWKINS, R., WILKSTROM, K., BORNSTEIN, P. 1994. Modulation of thrombospondin expression during differentiation of embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol.* **158**(3):495-505.
- MACK, J. A., ABRAMSON, S. R., BEN, Y., COFFIN, J. C., ROTHROCK, J. K., MAYTIN, E. V., HASCALL, V. C., LARGMAN, C., STELNICKI, E. J. 2003. Hoxb13 knockout adult skin exhibits high levels of hyaluronan and enhanced wound healing. *FASEB J.* **17**(10):1352-1354.
- MADRI, J. A., SANKAR, S., ROMANIC A. M. 1996. The molecular and cellular biology of wound repair. 2^e edition. *Éditeur*: R. A. F. Clark. Plenum Press, N.Y.
- MASON, I. J., MURPHY, D., MUNKE, M., FRANCKE, U., ELLIOTT, R. W., HOGAN, B. L. 1986. Developmental and transformation-sensitive expression of the Sparc gene on mouse chromosome 11. *EMBO J.* **5**(8):1831-1837.
- MAURER, P., MAYER, U., BRUCH, M., JENO, P., MANN, K., LANDWEHR, R., ENGEL, J., TIMPL, R. 1992. High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur J Biochem.* **205**(1):233-240.
- MAURER, P., SASAKI, T., MANN, K., GOHRING, W., SCHWARZBAUER, J. E., TIMPL, R. 1997. Structural and functional characterization of the extracellular calcium-binding protein BM-40/secreted protein, acidic, rich in

- cystein/osteonectin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem.* **248**:209-216.
- McBRIDE, O. W., FISHER, L. W., YOUNG, M. F. 1990. Localization of PGI (biglycan, BGN) and PGII (decorin, DCN, PG-40) genes on human chromosomes Xq13-qter and 12q, respectively. *Genomics.* **6**(2):219-225.
- McCAULEY, R. L., CHOPRA, V., LI, Y., HERNDON, D. N., ROBSON, M. C. 1992. Altered cytokine production in black patients with keloids. *J Clin Immunol* **12**:300-308.
- McVEY, J. H., NOMURA, S., KELLY, P., MASON, I. J., HOGAN, B. L. 1988. Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *J Biol Chem.* **263**(23):11111-11116.
- MOSHER, D. F. 1990. Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med.* **41**:85-97.
- MOTAMED, K., SAGE, E. H. 1998. SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J Cell Biochem.* **70**: 543-552.
- MURPHY-ULLRICH, J. E. 2001. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* **107**(7):785-790.
- NOH, Y. H., MATSUDA, K., HONG, Y. K., KUNSTFELD, R., RICCARDI, L., KOCH, M., OURA, H., DADRAS, S. S., STREIT, M., DETMAR, M. 2003. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration *in vitro* and tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *J Invest Dermatol.* **121**(6):1536-1543.
- O'ROUKE, K. M., LAHERTY, C. D., DIXIT, V. M. 1992. Thrombospondin 1 and thrombospondin 2 are expressed as both homo- and heterotrimers. *J Biol Chem.* **267**(35):24921-24924.
- ORTEGA, S., ITTMAN, M., TSANG, S. H., EHRLICH, M., BASILICO, C. 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:5672-5677.
- PANETTI, T. S., CHEN, H., MISENHEIMER, T. M., GETZLER, S. B., MOSHER, D.F. 1997. Endothelial cell mitogenesis induced by LPA: inhibition by thrombospondin-1 and thrombospondin-2. *J Lab Clin Med.* **129**(2):208-216.
- PEPPER, M. S., MONTESANO, R. 1990. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev.* **32**(3):319-327.
- PERKINS, N. R., REID, S. W., MORRIS, R. S. 2005. Profiling the New Zealand Thoroughbred racing industry. 2. Conditions interfering with training and racing. *N Z Vet J.* **53**(1):69-76.
- PICHLER, R. H., HUGO, C., SHANKLAND, S. J., REED, M. J., BASSUK, J. A., ANDOH, T. F., LOMBARDI, D. M., SCHWARTZ, S. M., BENNETT, W. M., ALPERS, C. E., SAGE, E. H., JOHNSON, R. J., COUSER, W. G. 1996. SPARC is expressed in renal interstitial fibrosis and in renal vascular injury. *Kidney Int.* **50**(6):1978-1989.
- PIERCE, G. F., TARPLEY, J. E., YANAGIHARA, D., MUSTOE, T. A., FOX G. M., THOMASON, A. 1992. Platelet-derived growth factor (BB homodimer),

- transforming growth factor-b1, and basic fibroblast growth factor in dermalwoundhealing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am Pathol.* **140**:1375-1388.
- POSTLETHWAITE, A. E., KANG, A. H. 1999. Fibroblasts and matrix proteins. *Dans Inflammation: Basic principles and clinical correlates.* 3^e édition. Éditeur: J. I. Gallin, R. Snyderman. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie, Pennsylvanie.
- PUOLAKKAINEN, P. A., BRADSHAW, A. D., BREKKEN, R. A., REED, M. J., KYRIAKIDES, T., FUNK, S. E., GOODEN, M. D., VERNON, R. B., WIGHT, T. N., BORNSTEIN, P., SAGE, E. H. 2005. SPARC-thrombospondin-2-double-null mice exhibit enhanced cutaneous wound healing and increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges. *J Histochem Cytochem.* **53**(5):571-581.
- RADA, J. A., CORNUET, P. K., HASSELL, J. R. 1993. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis *in vitro* by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res.* **56**(6):635-648.
- RUSSELL, S. B., TRUPIN, J. S., MYERS, J. C., BROQUIST, A. H., SMITH, J. C., MYLES, M. E., RUSSELL, J. D. 1989. Differential glucocorticoid regulation of collagen mRNAs in human dermal fibroblasts. Keloid-derived and fetal fibroblasts are refractory to down-regulation. *J Biol Chem.* **264**(23):13730-13735.
- SAGE, E. H., BORNSTEIN, P. 1991. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem.* **266**(23):14831-14834.
- SAIKA, S., OHNISHI, Y., OOSHIMA, A., LIU, C. Y., KAO, W. W. 2002. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea.* **21**(2 Suppl 1):S23-9.
- SALTMAN, D. L., DOLGANOV, G. M., WARRINGTON, J. A., WASMUTH, J. J., LOVETT, M. 1993. A physical map of 15 loci on human chromosome 5q23-q33 by two-color fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* **16**(3):726-732.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SASAKI, T., GOHRING, W., MANN, MAURER, P., HOHENESTER, E., KNAUPER, V., MURPHY, G., TIMPL, R. 1997. Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem.* **272**(14):9237-9243.
- SASAKI, T., HOHENESTER, E., GOHRING, W., TIMPL, R. 1998. Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* **17**(6):1625-1634.
- SATO, N., BEITZ, J. G., KATO, J., YAMAMOTO, M., CLARK, J. W., CALABRESI, P., RAYMOND, A., FRACKELTON, A. R. Jr. 1993. Platelet-derived growth factors indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **142**: 1119-1130.

- SAYAH, D. N., SOO, C., SHAW, W. W., WATSON, J., MESSADI, D., LONGAKER, M. T. ZHANG, X., TING, K. 1999. Downregulation of apoptosis-related genes in keloids tissues. *J Surg Res* **87**:209-216.
- SCHIEMANN, B. J., NEIL, J. R., SCHIEMANN, W. P. 2003. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor- β -signaling system. *Mol Biol Cell*. **14**(10):3977-3988.
- SCHOLZEN, T., SOLURSH, M., SUZUKI, S., REITER, R., MORGAN, J. L., BUCHBERG, A. M., SIRACUSA, L. D., IOZZO, R. V. 1994. The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment and expression during organogenesis and tissue differentiation. *J Biol Chem*. **269**(45):28270-28281.
- SCHULTZ-CHERRY, S., CHEN, H., MOSHER, D. F., MISENHEIMER, T. M., KRUTZSCH, H. C., ROBERTS, D. D., MURPHY-ULLRICH, J. E. 1995. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem*. **270**(13):7304-7310.
- SCHWARZBAUER, J. E., MUSSET-BILAL, F., RYAN, C. S. 1994. Extracellular calcium-binding protein SPARC/osteonectin in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol*. **245**:257-270.
- SCHWARTZ, A. J., WILSON, D. A., KEEGAN, K. G., GANJAM, V. K., SUN, Y., WEBER, K. T., ZHANG, J. 2002. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res*. **63**(11):1564-1570.
- SCOTT, J. E. 1991 Proteoglycan: collagen interactions and corneal ultrastructure. *Biochem Soc Trans*. **19**(4):877-881.
- SHAKESPEARE, V., SHAKESPEARE, P. 1991. Effects of granulation-tissue-conditioned medium on the growth of human keratinocytes in-vitro. *Br J Plast Surg*. **44**(3):219-223.
- SHINGU, T., BORNSTEIN, P. 1993. Characterization of the mouse thrombospondin 2 gene. *Genomics*. **16**(1):78-84.
- SINGER, A. J., CLARK, R. A. F. 1999. Cutaneous wound healing. *Dans Mechanisms of disease. Éditeur: F. H. Epstein. N. Engl. J. Med.* **341**(10):738-745.
- SOO, C., SAYAH, D. N., ZHANG, X., BEANES, S. R., NISHIMURA, I., DANG, C., FREYMILLER, E., TING, K. 2002. The identification of novel wound-healing genes through differential display. *Plast Reconstr Surg* **110**:787-797.
- SPORN, M. B., ROBERTS, A. B. 1991. Introduction: what is TGF-beta? *Ciba Found Symp*. **157**:1-6.
- STELNICKI, E. J., ARBEIT, J., CASS, D. L., SANER, C., HARRISON, M., LARGMAN, C. 1998. Modulation of the human homeobox genes PRX-2 and HOXB13 in scarless fetal wounds. *J Invest Dermatol*. **111**(1):57-63.
- STREIT, M., RICCARDI, L., VELASCO, P., BROWN, L. F., HAWIGHORST, T., BORNSTEIN, P., DETMAR, M. 1999. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci*. **96**: 14888-14893.

- SWAROOP, A., FRANCKE, U. 1987. Molecular cloning, cDNA sequence, and expression of human SPARC (osteonectin). *Am. J. Hum. Genet.* **41**:A240.
- SWAROOP, A., HOGAN, B. L. M., FRANCKE, U. 1988. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33. *Genomics.* **2**:37-47.
- SZTROLOVICS, R., RIMOIN, D. L., RODRIGUEZ, E., ROUGHLEY, R. J. 1994. Single-strand conformation polymorphism analysis of human decorin, biglycan and fibromodulin cDNAs. *Matrix Biol.* **14**(4):307-312.
- TARABOLETTI, G., BELOTTI, D., BORSOTTI, D., VERGANI, V., RUSNATI, M., PRESTA, M., GIAVAZZI, R. 1997. The 140-kilodalton antiangiogenic fragment of thrombospondin-1 binds to basic fibroblast growth factor. *Cell Growth Differ.* **8**(4):471-479.
- TERMINE, J. D., KLEINMAN, H. K., WHITSON, S. W., CONN, K. M., MCGARVEY, M. L., MARTIN, G. R. 1981. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* **26**: 99-105.
- THEORET, C. L. 2001a. Growth factors in cutaneous wound repair. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **23**(4):383-388.
- THEORET, C. L. 2001b. Growth factors in pathologic wound repair in horses. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **23**(5):479-482.
- THEORET, C. L., BARBER, S. M., MOYANA, T. N., GORDON, J. R. 2001. Expression of transforming growth factor beta(1), beta(3), and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *Vet Surg.* **30**(3):269-277.
- THEORET, C. L., BARBER, S. M., MOYANA, T. N., GORDON, J. R. 2002. Preliminary observations on expression of transforming growth factors β 1 and β 3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet Surg* **31**:266-273.
- THOMAS, D. W., HOPKINSON, I., HARDING, K. G., SHEPHERD, J. P. 1994. The pathogenesis of hypertrophic/keloids scarring. *Int J Oral Maxillfac Surg* **23**:232-236.
- TIZARD, I. R. 2000. *Veterinary immunology : An introduction.* 6^e edition. W. B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvanie.
- TONNESEN, M. G., FENG, X., CLARK, R. A. 2000. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **5**(1):40-46.
- TOONEY, P. A., SAKAI, T., SAKAI, K., AESCHLIMANN, D., MOSHER, D. F. 1998. Restricted localization of thrombospondin-2 protein during mouse embryogenesis: a comparison to thrombospondin-1. *Matrix Biol.* **17**, 131-143.
- TREDGET, E. E., NEDELEC, B., SCOTT, P. G., GHAHARY, A. 1997. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. *Wound Healing* **77**:701-730.
- TSOU, R., COLE, J. K., NATHENS, A. B., ISIK, F. F., HEIMBACH, D. M., ENGRAV, L. H., GIBRAN, N. S. 2000. Analysis of hypertrophic and normal scar gene expression with cDNA microarray. *J Burn Care Rehabil* **21**:541-550.
- TUAN, T. L., NICHTER, L. S. 1998. The molecular basis of keloids and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today* **4**:19-24.

- Van den BOOM, R., WILMINK, J. M., O'KANE, S., WOOD, J., FERGUSON, M. W. 2002. Transforming growth factor-beta levels during second-intention healing are related to the different course of wound contraction in horses and ponies. *Wound Repair Regen.* **10**(3):188-194.
- VIJ, N., ROBERTS, L., JOYCE, S., CHAKRAVARTI, S. 2005. Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating Fas-Fas ligand signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **46**(1):88-95.
- VOET, D., VOET, J. G. 1998. Biochimie. 2^e édition. De Boeck Université, Paris.
- VOLPERT, O. V., TOLSMA, S. S., PELLERIN, S., FEIGE, J. J., CHEN, H., MOSHER, D. F., BOUCK, N. 1995. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* **217**(1):326-332.
- WALTON, G. S., NEAL, P. A. 1972. Observations on wound healing in the horse. The role of wound contraction. *Equine Vet J.* **4**(2):93-97.
- WERNER, S., PETERS, K. G., LONGAKER, M. T., FULLER-PACE, F., BANDA, M. J., WILLIAMS, L. T. 1992. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6896-6900.
- WERNER, S., SMOLA, H., LIAO, X., LONGAKER, M. T., KRIEG, T., HOFSCHEIDER, P. H., WILLIAMS, L. T. 1994. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science.* **266**(5186):819-822.
- WILMINK, J. M., STOLK, P. W. T., van WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. 1999a. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. *Equine vet. J.* **31**:53-60.
- WILMINK, J. M., van WEEREN, P. R., STOLK, P. W. T., BARNEVELD, A. 1999b. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine vet. J.* **31**:61-67.
- WILMINK, J. M., NEDERBRAGT, H., van WEEREN, P. R., STOLK, P. W. T., BARNEVELD, A. 2001. Differences in wound contraction between horses and ponies: the *in vitro* contraction capacity of fibroblasts. *Equine vet. J.* **33**:499-505.
- WILMINK, J. M., Van HERTEN, J., Van WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. 2002. Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances. *Equine Vet J.* **34**(3):270-273.
- WILMINK, J. M., VEENMAN, J. N., van den BOOM, R., RUTTEN, V. P. M., NIEWOLD, T. A., BROEKHUISEN-DAVIES, J. M., LEES, P., ARMSTRONG, S., van WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. 2003. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine vet. J.* **35**:561-569.
- WHITE, P., THOMAS, D. W., FONG, S., STELNICKI, E., MEIJINK, F., LARGMAN, C., STEPHENS, P. 2003. Deletion of the homeobox gene PRX-2 affects fetal but not adult fibroblast wound healing responses. *J Invest Dermatol.* **120**(1):135-144.

- WU, J., MA, B., YI, S., WANG, Z., HE, W., LUO, G, CHEN, X. WANG, X., CHEN, A., BARISONI, D. 2004. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays. *J Trauma*. **57**:1276–1286.
- YANG, Z., KYRIAKIDES, T. R., BORNSTEIN, P. 2000. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell*. **11**(10):3353-3364.
- YANG, Z., STRICKLAND, BORNSTEIN, P. 2001. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem*. **276**(11):8403-8408.
- YEH, L. K., CHEN, W. L., LI, W., ESPANA, E. M., OUYANG, J., KAWAKITA, T., KAO, W. W., TSENG, S. C., LIU, C. Y. 2005. Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **46**(2):479-486.
- ZHOU, X., TAN, F. K., REVEILLE, J. D., WALLIS, D., MILEWICZ, D. M., AHN, C., WANG, A., ARNETT, F. C. 2002. Association of novel polymorphisms with the expression of SPARC in normal fibroblasts and with susceptibility to scleroderma. *Arthritis Rheum*. **46**(11): 2990–2999.
- ZHOU, X., TAN, F. K., GUO, X., WALLIS, D., MILEWICZ, D. M., XUE, S., ARNETT, F. C. 2005. Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum*. **52**(1):257-261.

