

27 11.3467.7

Université de Montréal

L'EXPRESSION TEMPORELLE DES GÈNES POUR PECAM1, PI10  
ET PEDF LORS DE LA GUÉRISON CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL

par

ZOË IPIÑA

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 science (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option biomédecine

Août, 2006

© Zoë Ipiña, 2006



SF  
607  
U54  
2007  
V.004

## 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 PECAM-1, PI10  
ET PEDF LORS DE LA GUÉRISON CUTANÉE CHEZ LE CHEVAL

Présenté par

ZOË IPIÑA

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

.....  
André Bisaillon, Président-rapporteur

.....  
Christine Theoret, directrice de recherche

.....  
Jacques Lussier, codirecteur

.....  
Michèle Doucet, Membre du jury

## Résumé

**Introduction:** Chez le cheval les plaies requièrent souvent des traitements dispendieux et prolongés. Une meilleure compréhension du processus de guérison pourrait résulter en des approches thérapeutiques innovatrices.

**Objectif:** Cloner et caractériser l'ADNc équin et déterminer l'expression temporelle de trois gènes lors de la guérison cutanée chez le cheval.

**Hypothèse:** L'expression sera caractéristique à chaque gène et diffèrera selon l'emplacement anatomique de la plaie.

**Méthode:** L'expression *in vivo* de PECAM1, de PI10 et de PEDF a été étudiée à partir d'un modèle équin comprenant des plaies au thorax, au membre antérieur et au membre bandé (guérissant avec bouton de chair). Des biopsies de peau intacte ainsi que du bord de la plaie (prélevées à 1, 2, 3, 4 et 6 semaines suivant le trauma) ont servi d'échantillons. L'ARN total a été isolé et transformé en ADNc puis amplifié. Chaque gène a été caractérisé chez le cheval puis l'expression temporelle a été établie par RT-PCR.

**Résultats:** L'expression de l'ARNm de PECAM1 a atteint et maintenu un plateau au début de la guérison autant au thorax qu'aux membres. Une expression plus faible de PI10 a été observé au thorax; son expression a augmenté à la première semaine puis a effectué un retour à un plateau pour ce qui est du thorax et du membre, tandis que le membre bandé a démontré un patron erratique. Un patron d'expression bimodal a été observé au thorax et au membre bandé, tandis qu'au membre l'expression a augmenté pendant les premières semaines pour atteindre un plateau durant la deuxième semaine.

**Conclusion:** L'expression génique de PECAM1, PI10 et PEDF ont démontré des patrons en ARNm spécifiques au cours de la guérison des plaies cutanées chez le cheval permettant d'élucider leur impact sur la guérison. Il serait maintenant intéressant de vérifier leur présence en tant que protéine à l'aide d'études immunohistochimiques.

**Mots clés :** PECAM1, PI10, PEDF, expression génique, guérison tissulaire, cheval.

## Abstract

**Introduction:** The wounds of horses often require expensive and prolonged treatment. A better comprehension of the mechanisms regulating wound healing could lead to innovative therapeutic approaches.

**Objective:** To clone and characterize the complete equine cDNA for PECAM1, PI10 and PEDF, and determine the temporal expression of their mRNA in cutaneous wound healing in the horse.

**Hypothesis:** The mRNA expression will be characteristic of each gene and will differ according to the type of wound.

**Method:** *In vivo* expression of PECAM1, PI10 and PEDF mRNA was studied in an equine model including wounds to the thorax, the limb and the bandaged limb (model of proud flesh). Biopsies of intact skin as well as wound edges (taken 1, 2, 3, 4 and 6 weeks following trauma) were used. Total RNA was isolated and transformed into cDNA. Each cDNA was characterized in the horse and their mRNA temporal expression pattern were analyzed by RT-PCR.

**Results:** The expression of PECAM1 reached and maintained a plateau early during the healing response within the thorax and limb wounds. Levels of expression for PI10 were weaker in thoracic wounds. Its expression increased the first week then decreased to level off for the remainder of the study in the thorax and the limb, while the bandaged limb presented an erratic pattern. A bimodal pattern was observed for PEDF within the thorax and the bandaged limb, while the limb showed an increase during the first weeks to finally reach a plateau towards the end of the study.

**Conclusion:** Expression analysis of PECAM1, PI10 and PEDF mRNA demonstrated a specific pattern of expression in cutaneous wound which helps understand their impact on wound healing. The next step of this study would be to confirm those patterns at the protein level with immunohistochemistry methods.

**Key words:** PECAM1, PI10, PEDF, wound healing, gene expression, horse.

## Table des matières

	Page
<b>Page titre</b> .....	i
<b>Page d'identification du jury</b> .....	ii
<b>Résumé</b> .....	iii
<b>Summary</b> .....	iv
<b>Table des matières</b> .....	v
<b>Liste des tableaux</b> .....	vii
<b>Liste des figures</b> .....	viii
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	ix
<b>Remerciements</b> .....	xi
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Recension de la littérature</b> .....	2
1. Guérison cutanée chez l'adulte.....	2
1.1 L'inflammation et sa résolution.....	2
1.1.1 Rôle des plaquettes.....	2
1.1.2 Rôle des neutrophiles.....	3
1.1.3 Rôle des macrophages.....	4
1.2 Prolifération cellulaire.....	5
1.2.1 La réépithélialisation.....	5
1.2.2 L'angiogenèse.....	6
1.2.3 La fibroplasie.....	8
1.3 Synthèse et remodelage.....	8
1.3.1 La contraction.....	9
1.3.2 Le remodelage.....	10
2. Guérison cutanée problématique.....	11
2.1 Les plaies chroniques.....	11
2.2 Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes.....	12
3. Guérison cutanée chez le cheval.....	14
3.1 Plaies thoraciques vs plaies sur les membres.....	14
4. Contrôle génique.....	15
4.1. PECAM1.....	15
4.1.1. Structure.....	15
4.1.2. Distribution.....	16
4.1.3. Expression.....	17
4.1.4. Fonctions biologiques potentielles.....	18
4.1.4.1. Apoptose.....	18
4.1.4.2. Migration.....	18
4.1.4.3. Inflammation.....	19
4.1.4.4. Angiogenèse.....	19
4.2 PI10.....	20
4.3 PEDF.....	22
4.3.1. Structure.....	22
4.3.2. Distribution et expression.....	23
4.3.3. Fonctions.....	24
4.3.3.1. Angiogenèse.....	24
4.3.3.2. Apoptose.....	27
4.3.3.3. Protection des neurones.....	28

4.3.3.4. Anti-inflammatoire.....	28
4.3.4. Usages cliniques.....	28
5. Hypothèse et objectif.....	29
<b>Méthodologie</b> .....	31
1. Modèle expérimental.....	31
1.1 Chevaux.....	31
1.2 Procédure chirurgicale.....	31
1.3 Suivi post-opératoire.....	32
1.4 Prise d'échantillons.....	33
2. Caractérisation de l'ADN complet.....	33
2.1 Obtention des sondes radioactives.....	33
2.1.1 Préparation des sondes.....	33
2.1.2 Marquage des sondes par amorces aléatoires.....	34
2.2 Détermination du poids moléculaire de l'ADNc pleine longueur par Northern virtuel.....	35
2.2.1 Préparation des membranes.....	35
2.2.2 Hybridation des membranes.....	36
2.2.3 Détermination de la grandeur de l'ADNc complet.....	36
2.3 Préparation de la mini-génothèque d'ADNc.....	36
2.4 Établissement de la mini-génothèque d'ADNc.....	37
2.4.1 Ligation des ADNc amplifiés par PCR.....	37
2.4.2 Transformation bactérienne.....	38
2.4.3 Repiquage des colonies bactériennes.....	38
2.4.4 Traitement des membranes.....	38
2.5 Criblage de la mini-génothèque d'ADNc.....	39
2.5.1 Hybridation des membranes.....	39
2.5.2 Choix des clones positifs.....	39
3. Expression temporelle du gène.....	40
3.1 Extraction de l'ARN total.....	40
3.2 Analyse de l'expression de l'ARNm par RT-PCR semi-quantitatif.....	41
4. Analyse statistique.....	44
<b>Résultats</b> .....	45
1. Clonage et caractérisation de l'ADNc équien pour PECAM1, PI10 et PEDF.....	45
2. Expression temporelle de l'ARNm par RT-PCR semi-quantitatif pour PECAM1, PI10 et PEDF dans les plaies thoraciques, dans les plaies aux membres guérissant normalement ou dans les plaies développant du tissu de granulation excessif.....	48
<b>Discussion</b> .....	73
<b>Conclusion</b> .....	80
<b>Bibliographie</b> .....	81



Liste des tableaux

	<u>Page</u>
Tableau I	Synthèse du contrôle génique 29
Tableau II	Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR 34
Tableau III	Liste des oligonucléotides utilisés et qui sont fournis dans la trousse « SMART PCR cDNA Synthesis » de Clontech 42
Tableau IV	Liste des oligonucléotides formulés pour l'expression temporelle 43
Tableau V	Identité des séquences d'ADNc équines avec les séquences d'autres espèces 47

## Liste des figures

		Page
Figure 1	Étapes de la guérison tissulaire.	11
Figure 2	Schéma montrant qu'un équilibre dynamique entre VEGF et PEDF est essentiel pour le comportement des cellules choroïdales endothéliales.	26
Figure 3	Emplacement des lésions créées sur les membres et sur le thorax.	32
Figure 4	Étapes de la transformation des ARNm en ADNc double brins à l'aide de la trousse « SMART PCR cDNA synthesis ».	42
Figure 5	Schéma résumant la méthodologie.	44
Figure 6	Séquence en acides nucléiques et aminés de PECAM1 équin.	49
Figure 7	Séquence en acides nucléiques et aminés de PI10 équin.	52
Figure 8	Séquence en acides nucléiques et aminés de PEDF équin.	55
Figure 9	Comparaison de la séquence d'acides aminés de PECAM1 équin	57
Figure 10	Comparaison de la séquence d'acides aminés de PI10 équin	61
Figure 11	Comparaison de la séquence d'acides aminés de PEDF équin	64
Figure 12	Expression temporelle de PECAM1, PI10 et PEDF lors de la guérison tissulaire chez le cheval.	67
Figure 13	Patron d'expression de PECAM1, PI10 et PEDF lors de la guérison tissulaire chez le cheval, résultats simplifiés.	72
Figure 14	Phases de la guérison	77

## Liste des sigles et abréviations

---

μCi	microCurie
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
α-SMA	actine α des muscles lisses
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
aFGF	facteur de croissance du fibroblaste de type acide
AGT	angiotensinogène
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AT3	antithrombine III
bFGF	facteur de croissance du fibroblaste de type basique
CCl <sub>4</sub>	tétrachlorure de carbone
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CD99	antigène CD99
cm	centimètre
CRRA	Centre de Recherche en Reproduction Animale
dCTP	Déoxycytosine triphosphate
DEPC	diéthylpyrocarbonate
EGF	« epidermal growth factor »
FGF	facteur de croissance du fibroblaste
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GM-CSF	facteur stimulant de colonie de granulocyte-macrophage
h	heure
HSS	hybridation soustractive suppressive
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IL-1	interleukine-1
IL-1β	interleukine-1 beta
IL-6	interleukine-6
kDa	kilo dalton
KGF	« keratinocyte growth factor »
LB	agar Luria-Bertani
M	molaire
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
MMLV	« Moloney murine leukemia virus »
MMP	métalloprotéinase de matrice
N	normale
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NIH	«National Institute of Health»
NK	« natural killer »
nM	nanomolaire
nm	nanomole

---

---

P <sup>32</sup>	Phosphore radioactif
PAI-1	inhibiteur de l'activateur de plasminogène de type 1
PAI-2	inhibiteur de l'activateur de plasminogène de type 2
pb	paire de base
PCR	« polymerase chain reaction »
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM1	« platelet endothelial cell adhesion molecule 1 »
PEDF	« pigment épithelial derived factor »
PI7	protéinase nexine 1
PI8	ovalbumine
PI10	inhibiteur de protéinase 10
PI15	maspin
PLI	$\alpha$ 2-antiplasmine
RSB	Research Services Branch
RT-PCR	« retro-transcription polymerase chain reaction »
TAE	tampon tris-acide acétique-EDTA
TBE	tampon tris-borate
TE	tampon tris-EDTA
TIMP	inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase
TGF- $\alpha$	facteur de croissance transformant $\alpha$
TGF- $\beta$	facteur de croissance transformant $\beta$
THP-1	lignée cellulaire
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale alpha
TSP-1	thrombospondine-1
UTR	«uptranslated region»
UV	ultra-violet
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

---

## **Remerciements**

Je tiens particulièrement à remercier Dr. Christine Theoret pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire. Ce fut une expérience enrichissante et je crois qu'il est un privilège d'avoir travaillé avec une directrice de maîtrise aussi dévouée pour ses étudiants autant au niveau professionnel que personnel. J'ai aussi eu la chance de travailler avec Dr. Jacques Lussier à qui je dois l'apprentissage des techniques de biologie moléculaire et bien des heures de «trouble shooting ». Le travail de laboratoire peut parfois être long et répétitif mais parfois il exige aussi de bon remue-méninges pour faire avancer les choses. Dans les deux cas j'ai toujours pu compter sur notre assistante de recherche Josiane Lefebvre-Lavoie pour avoir un bon coup de main ou tout simplement pour rire en travaillant. Le travail à la faculté m'a aussi permis de rencontrer et d'échanger avec des étudiants des autres laboratoires et même d'autres horizons et ainsi de bâtir de nouvelles amitiés. Ainsi, j'aimerais remercier tous ceux qui ont fait partie du laboratoire de guérison tissulaire ou qui l'ont fréquenté pour leur aide et leur présence. Finalement, je tiens à souligner l'appui que ma famille et mes amis m'ont apporté tout au long de mon projet particulièrement mes parents ainsi que Sophie et Éric; ils font partie intégrante de ma réussite.

## Introduction

La guérison tissulaire est un processus dynamique interpellant trois phases qui se superposent dans le temps : l'inflammation, la prolifération cellulaire et la synthèse tissulaire avec son remodelage. Elle fait entrer en jeu des interactions cellulaires, moléculaires, physiologiques et biochimiques complexes pour rétablir l'intégrité structurale des tissus endommagés. On y retrouve ainsi comme acteurs: des médiateurs solubles, des cellules sanguines, des cellules parenchymateuses et la matrice extracellulaire. Le déroulement de la guérison est sous le contrôle de nombreux gènes qui sont exprimés transitoirement. Les protéines codées par ces gènes initient ou altèrent les cascades de signalisation intracellulaire et engendrent différents mécanismes requis pour le processus de guérison. Faisant partie de la phase proliférative, l'angiogenèse est une étape primordiale à l'accomplissement de la guérison tissulaire. C'est par l'entremise de nouveaux vaisseaux que sont acheminés les nutriments utiles aux cellules participant à la réparation, si ce ne sont pas les cellules elles-mêmes qui empruntent ce transport.

L'accomplissement de la guérison tissulaire chez un mammifère adulte résulte en la formation d'une cicatrice, c'est-à-dire que le tissu initial n'est pas régénéré mais plutôt réparé. Le nouveau tissu ne contient pas tous les éléments différenciés du tissu initial, ni sa force. Un objectif principal de la recherche dans le domaine de la cicatrisation est de mieux en saisir sa régulation génique. La compréhension du contrôle génique de la guérison normale ainsi que de la guérison pathologique fournirait de l'information cruciale à la résolution des problèmes de cicatrisation.

Les blessures cutanées sont fréquentes chez le cheval et requièrent souvent des traitements dispendieux et prolongés. La guérison par seconde intention chez les chevaux est associée à des phases prolongées d'inflammation et de fibroplasie ainsi qu'à des problèmes comme la production excessive de tissu de granulation. Il serait ainsi intéressant de mieux comprendre le processus de guérison. Dans le but d'avancer notre compréhension dans ce domaine, l'objectif de cette étude est de cloner et caractériser trois ADNc équin liés à l'angiogenèse et de déterminer leur l'expression temporelle de la guérison tissulaire chez le cheval.

# **Recension de la littérature**

## **1. Guérison cutanée chez l'adulte**

La guérison tissulaire est un processus dynamique interpellant trois phases qui se superposent dans le temps : l'inflammation, la prolifération cellulaire et la synthèse tissulaire avec son remodelage. Elle fait entrer en jeu des interactions cellulaires, moléculaires, physiologiques et biochimiques complexes pour rétablir l'intégrité structurale des tissus endommagés (Theoret, 2001). On y retrouve ainsi comme acteurs des médiateurs solubles, des cellules sanguines, la matrice extracellulaire et des cellules parenchymateuses (Singer et Clark, 1999).

### **1.1 L'inflammation et sa résolution**

L'inflammation est la première réponse de l'organisme à une blessure. Il s'agit d'un moyen de défense non spécifique qui se déroule principalement en trois étapes : la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins, la diapédèse des phagocytes et la réparation tissulaire (Tortora et Grabowski, 2001). Deux objectifs sont ciblés durant cette phase, soit le rétablissement de l'homéostasie par le contrôle des dommages cellulaires et de la perte de sang, ainsi que le retrait des débris et le contrôle ou l'élimination d'agents infectieux (Worley, 2004a). L'intensité de l'inflammation est généralement fortement et positivement corrélée avec la sévérité du trauma. L'inflammation est habituellement considérée comme salutaire; paradoxalement, elle pourrait contribuer à la guérison pathologique (Theoret, 2001).

#### **1.1.1. Rôle des plaquettes**

La toute première réaction à la suite d'un trauma cutané est la contraction des vaisseaux sanguins endommagés pour une durée de 5 à 10 minutes suivie d'une vasodilatation locale pour promouvoir le passage de cellules, fluide et protéines au travers de la paroi du vaisseau sanguin vers le site de la plaie (Theoret, 2005). La mise à nue de la matrice sous-endothéliale d'un vaisseau active l'adhésion plaquettaire (Marcus,

1986). Les plaquettes roulant sur cette surface collagénique sont arrêtées et activées et elles relâchent alors le contenu de leurs granules.

Le contenu des granules relâchées par les plaquettes comprend des protéines extracellulaires mais aussi matricellulaires. Parmi ces protéines on retrouve la thrombospondine-1 (TSP-1) qui peut se lier au fibrinogène et à la fibronectine associés à la matrice provisoire déposée dans le lit d'une plaie (Bornstein, 2001). Des médiateurs chémoattractants et des agents mitogènes de type « cytokine » (ex. PDGF, TGF- $\alpha$  et  $\beta$ , EGF) seront également relâchés et vont initier et amplifier les étapes subséquentes de la réparation (Theoret, 2001). Les deux signaux les plus importants sont le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Le PDGF initie la chémotaxie des neutrophiles, des macrophages, des cellules de muscle lisse et des fibroblastes. De plus, il stimule la mitogénèse des fibroblastes et des cellules de muscle lisse. TGF- $\beta$  attire les macrophages et les stimule à sécréter des cytokines additionnelles incluant le facteur de croissance du fibroblaste (FGF), PDGF, le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 (IL-1). De plus, le TGF- $\beta$  augmente la chémotaxie des fibroblastes et des cellules de muscle lisse et module l'expression du collagène et de la collagénase (Diegelmann et Evans, 2004). Pour rétablir l'homéostasie, il y aura donc la formation d'un caillot sanguin qui servira en plus d'échafaud pour la migration cellulaire. Ce caillot viendra qu'à se dessécher et former l'escarre, appelée communément galle, qui finira par tomber. Durant la phase inflammatoire, la force de la plaie dépend majoritairement de la fibrine dans le caillot de sang. Cette matrice extracellulaire provisoire faite des produits relâchés par les plaquettes et les cellules inflammatoires est remplacée par du tissu de granulation dans la prochaine phase de la guérison (Theoret, 2005).

### **1.1.2. Rôle des neutrophiles**

Suite à la vasoconstriction et la vasodilatation initiales, les cellules prédominantes seront les neutrophiles (Diegelmann et Evans, 2004). Au jour 1 suivant la blessure, ils constitueraient presque 50% de la population cellulaire. Parce qu'ils sont très abondants dans la circulation, un grand nombre de neutrophiles se rassemblent passivement au site



d'une lésion. Plusieurs chemoattractants contrôlent le transit des neutrophiles. Cependant, on sait que la réponse chémotaxique sera saturée par une concentration accrue d'attracteurs spécifiques à un récepteur causant une désensibilisation et une régulation à la baisse de ce récepteur. De cette façon, les neutrophiles arrêteraient leur déplacement et resteraient diffusément distribués dans le caillot sanguin (Gillitzer et Goebeler, 2001). Ainsi, certaines molécules qui sont pro-inflammatoires durant la phase aiguë de l'inflammation servent à limiter la réponse inflammatoire plus tard, protégeant de ce fait le tissu sain adjacent à la blessure (Midwood *et al.*, 2004). Les neutrophiles restant dans les tissus viables meurent en quelques jours et sont enlevés par les macrophages tissulaires.

Les neutrophiles sont une importante source de cytokines pro-inflammatoires sans toutefois être essentiels au processus de réparation de plaies non infectées. Une fois sur le site de la blessure, les neutrophiles détruisent les débris par phagocytose à l'aide de mécanismes enzymatiques et de radicaux libres. Au moins deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 et TNF- $\alpha$ , favorisent cette activité. Ces cytokines aident aussi au débridement en augmentant la production de collagénase et d'autres métalloprotéinases (Theoret, 2001). La réponse inflammatoire décline au troisième jour, ceci étant marqué par la disparition de neutrophiles dans la plaie (Childress et Stechmiller, 2002) qui sont éliminés avec l'escarre ou bien phagocytés par les macrophages (Singer et Clark, 1999).

### **1.1.3. Rôle des macrophages**

Les neutrophiles sont remplacés en quelques jours par des macrophages. Ceux-ci migrent dans la plaie 48 à 96 heures suivant le trauma pour en devenir la population cellulaire prédominante. Les macrophages participent à et concluent la phase inflammatoire et le débridement. Leur fonction antimicrobienne vient de la phagocytose mais aussi de la génération de radicaux réactifs comme l'oxyde d'azote, l'oxygène et le peroxyde. Le débridement est facilité par la phagocytose et par la production d'enzymes comme la collagénase et l'élastase (Park et Barbul, 2004). Ces macrophages activés relâchent des cytokines, incluant le PDGF, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'interleukine-6 (IL-6). De plus, les macrophages relâchent des cytokines qui agissent de façon paracrine pour

recruter d'autres cellules impliquées dans la guérison, telles le macrophage ou le lymphocyte. Les cytokines contrôlent aussi la chémotaxie des fibroblastes, leur prolifération et leur synthèse collagénique (Park et Barbul, 2004). Bien qu'il existe de la controverse à ce sujet, (Martin *et al.*, 2003) le macrophage est classiquement défini comme étant la cellule la plus critique au déroulement normal de la guérison (Singer et Clark, 1999; Diegelmann et Evans, 2004; Worley, 2004b).

## **1.2 Prolifération cellulaire**

Chevauchant la résolution de l'inflammation, la phase proliférative inclut une rapide réépithélialisation ainsi que la formation de tissu de granulation. On peut distinguer trois composantes de la phase proliférative soit : la réépithélialisation, l'angiogenèse et la fibroplasie. Les macrophages débrident les tissus et produisent des médiateurs tels les cytokines qui stimulent l'angiogenèse et la fibroplasie. Les fibroblastes quant à eux répondent en migrant, proliférant et en formant une nouvelle matrice extracellulaire que les macrophages, les nouveaux vaisseaux sanguins et les fibroblastes vont utiliser comme substrat à la migration. Finalement, les nouveaux vaisseaux sanguins apportent l'oxygène et les nutriments nécessaires au métabolisme et à la croissance cellulaire (Theoret, 2001; Worley, 2004b).

### **1.2.1 La réépithélialisation**

L'épithélium avance non seulement depuis les contours de la plaie mais aussi des structures annexes, comme les follicules pileux lorsqu'elles sont encore présentes. L'épithélium avance à la surface du tissu de granulation sain pour établir une couverture temporaire (Fitch et Swaim, 1995). Comme la migration cellulaire est exclusive à un lit humide et vascularisé, la réépithélialisation est retardée jusqu'à ce qu'un tissu de granulation sain soit établi (Worley, 2004b). L'épithélium entourant la plaie migre et prolifère dans une courte période de temps. Le processus commence par la mobilisation de cellules basales de l'épiderme au bord de la plaie en réponse entre autres au TGF- $\alpha$  et au epidermal growth factor (EGF). À 24 h suivant le trauma, les cellules épithéliales prolifèrent jusqu'à ce que la blessure soit complètement recouverte (Childress et

Stechmiller, 2002). Pour ce faire les cellules épithéliales doivent changer de phénotype : elles rétractent leurs tonofilaments intracellulaires puis il y a dissolution des desmosomes intercellulaires ainsi que des hémidesmosomes entre l'épiderme et la membrane basale, ainsi que formation de filaments d'actine cytoplasmique périphériques.

L'expression de récepteurs à intégrine sur les cellules épidermiques leur permet d'interagir avec une variété de protéines de la matrice extracellulaire (ex. fibronectine, vitronectine) interposées avec le collagène de type I au bord de la blessure et entrelacées avec la fibrine du caillot. Les cellules épidermiques migratrices dissèquent l'escarre du tissu viable (Singer et Clark, 1999). Différentes métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont impliquées dans ces processus complexes. Par exemple, l'expression de collagénase interstitielle (MMP-1) lors de migration de cellules épithéliales basales est caractéristique de la guérison par seconde intention. Il est assumé que l'interaction entre le collagène de type I et l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  des cellules épithéliales entraîne l'expression de MMPs, permettant la migration (Herouy, 2001). Une fois la monocouche de cellules épithéliales établie, elle commence à s'attacher à la nouvelle membrane basale et à se différencier en un épiderme stratifié. Cette étape peut prendre de quelques semaines à plusieurs mois, même que certaines plaies très étendues peuvent ne jamais arriver à se réépithélialiser complètement (Theoret, 2005).

### 1.2.2 L'angiogenèse

En réponse à une blessure, les cellules endothéliales microvasculaires initient le processus angiogénique consistant en l'induction de l'hyperperméabilité microvasculaire, de la dégradation locale de leur membrane basale, de leur migration et de leur émergence dans le stroma local. La prolifération cellulaire et la formation de tissu de granulation, la reconstruction de la membrane basale et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins s'ensuivent pour que finalement, la nouvelle vascularisation régresse et disparaisse lors de la phase de remodelage.

L'angiogenèse est très importante lors de la guérison cutanée. Par la création de nouveaux vaisseaux sanguins elle apporte l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules qui participent à la guérison. De plus, les cellules inflammatoires ont besoin

d'interagir avec la membrane basale endothéliale pour accéder au site de la blessure. D'ailleurs, plusieurs signaux pour l'angiogenèse émanent de la phase inflammatoire (Li *et al.*, 2003). L'angiogenèse est un processus dynamique hautement régulé qui dépend des interactions entre l'endothélium vasculaire et des signaux à la fois du sérum et de la matrice extracellulaire environnante (McColl *et al.*, 2004). Le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), l'angiopoïétine, le FGF et le TGF- $\beta$  sont parmi les cytokines angiogéniques les plus importantes lors de guérison. Leur régulation précise est essentielle à la réussite de la guérison (Li *et al.*, 2003). Le VEGF est le régulateur central de la cascade angiogénique; il est un médiateur de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales (Costa *et al.*, 2004).

La migration des cellules endothéliales et le développement de nouveaux capillaires durant la guérison dépendent aussi de la production et de l'organisation de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire contrôle l'angiogenèse en étant son échafaud, un réservoir et un modulateur de cytokines, mais aussi en lui lançant des signaux (Li *et al.*, 2003). La membrane basale vasculaire, comme la matrice extracellulaire, séquestre des facteurs angiogéniques et des inhibiteurs qui deviennent disponibles grâce à la protéolyse de la matrice par des enzymes comme les collagénases, les cathepsines et les élastases (Sund *et al.*, 2004).

Tout comme la réépithélialisation, l'angiogenèse implique un changement de phénotype des cellules endothéliales, une migration dirigée et plusieurs stimuli mitogéniques. Initialement, les cellules endothéliales au bout des capillaires migrent dans la plaie sans avoir proliféré activement. Ce sont les facteurs chimiotaxiques fournis par les cellules avoisinantes et la matrice qui initient cette migration. Une matrice extracellulaire préexistante est alors essentielle à la formation de nouveaux vaisseaux. Aussi, une faible concentration d'oxygène, l'acide lactique et les amines biogéniques vont stimuler l'angiogenèse durant la guérison (Li *et al.*, 2003). En fait, lors d'hypoxie, des altérations métaboliques ont lieu dans la cellule, incluant la synthèse de cytokines pro-angiogéniques visant l'endothélium vasculaire, le plus notable étant le VEGF. De plus, il a été démontré que l'hypoxie est un régulateur majeur de VEGF *in vivo* et *in vitro* (McColl *et al.*, 2004).

### 1.2.3 La fibroplasie

Les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales s'infiltrent au site de la blessure en réponse aux cytokines induites par les macrophages, particulièrement IL-1, TNF $\alpha$ , insulin-like growth factor-I (IGF-I), PDGF, EGF, FGF et TGF- $\beta$ , (Theoret, 2005) afin de former le tissu de granulation (Childress et Stechmiller, 2002). Les fibroblastes produisent à leur tour IGF-I, FGF, TGF- $\beta$ , PDGF, et des cytokines de cellules épithéliales (EGF et KGF). Les cellules endothéliales quant à elles sécrètent le VEGF, basic FGF et PDGF. Les cellules épithéliales vont relâcher du TGF- $\beta$  et du TGF- $\alpha$ . Sous l'influence du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , les fibroblastes sont stimulés à synthétiser du collagène, à augmenter les concentrations de MMPs et à diminuer la présence d'inhibiteurs des metalloprotéinases (TIMPs), favorisant ainsi le dépôt de nouveau collagène (Childress et Stechmiller, 2002).

Élément important de la fibroplasie, le TGF- $\beta$ , contrôle indirectement la prolifération des fibroblastes et stimule directement la production de matrice tout en inhibant sa dégradation (Clark, 1996b). En réponse à un trauma, les fibroblastes résidant dans les tissus environnants vont proliférer au cours des trois premiers jours puis migrer à partir du quatrième jour (Clark, 1993). La migration cellulaire dans le caillot sanguin est facilitée par la présence d'enzymes dégradantes dérivées du fibroblaste, dont la production et la sécrétion sont stimulées par le PDGF et le TGF- $\beta$ . Le fibroblaste adopte ensuite un phénotype synthétique afin de remplacer la matrice provisoire (fibrine, fibronectine et hyaluronane) par des glycoprotéines, protéoglycans, et du collagène immature et mature pour renouer les bords de la plaie (Theoret, 2005). Au septième jour, une matrice extracellulaire abondante s'est accumulée et le fibroblaste change à nouveau de phénotype pour devenir contractile (myofibroblaste) et assurer ainsi le rapprochement des bords de la plaie (contraction). Finalement, le myofibroblaste disparaîtra par apoptose (Clark, 1993).

### 1.3 Synthèse et remodelage

La synthèse et le remodelage constituent la dernière phase de la guérison qui peut s'étendre sur une période de plusieurs mois, durant laquelle contraction et remodelage se

feront en simultané pour arriver à la cicatrice finale. La résistance du tissu de réparation continue d'augmenter lentement suite au remodelage du collagène, dont les faisceaux deviennent larges et s'alignent le long des lignes de tension. L'augmentation du nombre de liens intermoléculaires dans la cicatrice soutient également cette force. Cependant, les blessures qui incluent la profondeur totale de la peau vont récupérer seulement 75% à 80% de la force du tissu initial (Theoret, 2005).

### 1.3.1 La contraction

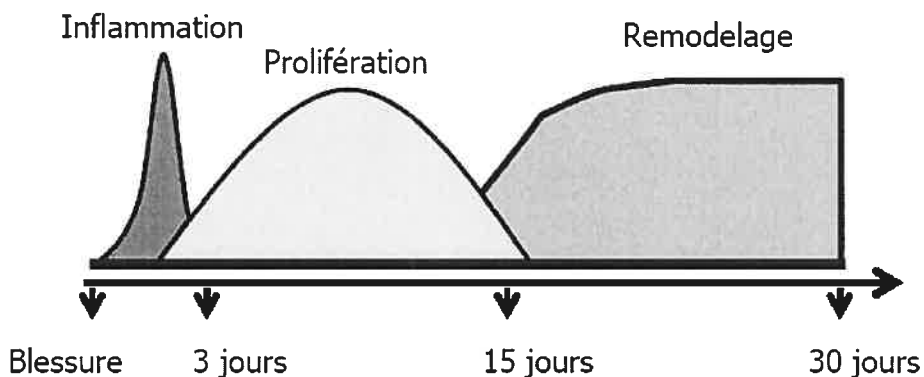
La contraction implique l'interaction complexe de cellules, de matrice extracellulaire et de cytokines. Durant la deuxième semaine de guérison, les fibroblastes assument le phénotype de myofibroblastes, caractérisé par de larges faisceaux contenant des microfilaments d'actine disposés le long de la face cytoplasmique de la membrane plasmique et par des liens cellules-cellules et cellules-matrice (Singer et Clark, 1999). Ce changement de phénotype est attribué à la production par les cellules inflammatoires et possiblement par les fibroblastes, de TGF- $\beta$ 1 (Desmouliere *et al.*, 2005). La présence de ces myofibroblastes facilite la fermeture de la plaie par des forces de traction et par la contraction (Desmouliere *et al.*, 2003). La contraction requiert probablement une stimulation par le TGF- $\beta$  et le PDGF, l'attachement des fibroblastes à la matrice de collagène via les récepteurs de type intégrine et le croisement entre les faisceaux individuels de collagène (Singer et Clark, 1999).

Il est largement accepté que l'actine  $\alpha$  des muscles lisses ( $\alpha$ -SMA) soit un marqueur de cellules à fonctions contractiles. Des travaux sur la contraction *in vitro* ont développé des cultures de fibroblastes dans des gels de collagène soit flottants, soit ancrés pour comprendre l'influence de la tension sur ceux-ci. Les fibroblastes des gels flottants, ressemblant à ceux du derme intact, n'ont pas développé de caractéristiques contractiles contrairement à ceux dans les gels ancrés qui s'apparentaient au tissu de granulation. Aussi, d'importantes différences dans la prolifération des cellules et dans la synthèse collagénique ont été notées. Ces résultats suggèrent que les forces mécaniques d'un tissu peuvent contrôler la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que l'organisation de la matrice cellulaire (Clark, 1996a).

### 1.3.2 Le remodelage

Le remodelage commence alors que la prolifération cellulaire et l'angiogénèse terminent. À cette étape, synthèse et dégradation s'équilibrent en réponse à la sécrétion de substances stimulatrices et inhibitrices produites notamment par les fibroblastes (Childress et Stechmiller, 2002). Le remodelage du collagène lors de la transition du tissu de granulation à la cicatrice dépend d'une synthèse continue et d'un catabolisme à faible taux. Ce dernier est effectué par plusieurs enzymes de type MMP, sécrétées par les macrophages, les cellules de l'épiderme, les cellules endothéliales ainsi que par les fibroblastes (Singer et Clark, 1999). Parmi ces MMPs on retrouve plus particulièrement le MMP-1 (une collagénase), les MMP-2 et MMP-9 (des gélatinases) et le MMP-3 (la stromelysine). L'effet destructeur de ces enzymes sur le tissu sain est limité par la présence de TIMP-1 et TIMP-2, aussi sécrétés par les fibroblastes. L'interaction complexe entre les MMPs et les TIMPs est la clé du remodelage (Childress et Stechmiller, 2002).

En résumé, la guérison tissulaire débute par une phase inflammatoire. Cette étape répond aux objectifs de rétablissement de l'homéostasie, principalement assumés par les plaquettes, ainsi qu'à ceux de retrait des débris et de contrôle ou d'élimination d'agents infectieux principalement assumés par les neutrophiles et les macrophages. Suit la phase proliférative où l'épiderme réépithélialise la plaie, les cellules endothéliales initient l'angiogénèse et les fibroblastes produisent le collagène nécessaire à la fibroplasie. Finalement la synthèse et le remodelage de la matrice extracellulaire sont effectués principalement par les fibroblastes. Cette dernière phase est accompagnée d'une contraction de la plaie ainsi que d'une baisse de la cellularité et de la vascularisation.



**Figure 1. Étapes de la guérison tissulaire.**

## **2. Guérison cutanée problématique**

### **2.1 Les plaies chroniques**

Une plaie qui subit l'influence d'un trauma répété ou d'ischémie, par exemple, peut atteindre un état chronique. Dans ce cas, l'inflammation n'arrive pas à se résoudre en raison, d'une part, de l'influx soutenu de neutrophiles et de macrophages suite à l'exposition à un environnement insalubre. L'équilibre cytokinique qui guide normalement les différentes phases de la réparation est rompu, ce qui empêche une prompt évolution du processus de guérison. D'autre part, même si l'infiltration de neutrophiles et le relâchement des enzymes qui y sont reliés jouent un rôle important lors de la guérison normale, un relâchement désordonné de ces protéinases dans le milieu extracellulaire peut endommager et détruire les tissus sains. Pour se protéger de ces dommages les mammifères possèdent une batterie d'inhibiteurs de protéinases dont l'inhibiteur de protéinase  $\alpha 1$ , l' $\alpha 2$ -macroglobuline, l' $\alpha 1$ -antichymotrypsin, les TIMPs et l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène (PAI-1). Néanmoins, dans certaines conditions le recrutement de cellules inflammatoires surpasse la capacité inhibitrice de protéinases dans les tissus sains, menant à la chronicité de la plaie (Yager et Nwomeh, 1999). En général, l'environnement des plaies chroniques souffre d'une activité mitogénique réduite ainsi que d'une concentration plus élevée de cytokines inflammatoires et de protéinases (Schultz et Mast, 1998).



## 2.2 Les cicatrices hypertrophiques et les chéloïdes

L'accumulation d'une quantité excessive de collagène peut donner lieu à une cicatrice surélevée qu'on qualifie d'hypertrophique si le tissu cicatriciel s'amasse à l'intérieur des limites originales de la plaie. On parlera plutôt de chéloïde si le tissu de cicatrisation croît au-delà des limites originales et que la lésion ne régresse pas spontanément. Ces deux conditions démontrent des différences importantes avec les cicatrices normales et la peau non lésée. Les fibroblastes provenant d'un chéloïde démontrent une plus forte croissance que ceux provenant du derme normal (Luo *et al.*, 2001) et répondent plus intensément aux cytokines tels PDGF (Haisa *et al.*, 1994) et TGF- $\beta$  (Bettinger *et al.*, 1996). Les fibroblastes de cicatrice hypertrophique démontrent également une expression soutenue de récepteurs au TGF- $\beta$  de types I et II, ce qui augmente leur réponse à cette cytokine pro-fibrotique (Schmid *et al.*, 1998). Malgré ces différences, les chéloïdes et les cicatrices hypertrophiques partagent une physiopathologie similaire. En effet, ils semblent tous deux résulter d'une phase proliférative exagérée où il y a un déséquilibre entre la synthèse de composants de la matrice extracellulaire et leur dégradation et remodelage, favorisant ainsi la fibrose excessive (Tredget *et al.*, 1997; Tuan et Nichter, 1998).

La cause précise du développement de cicatrices hypertrophiques et de chéloïdes est inconnue, mais les théories abondent. Il semblerait y avoir une prédisposition génétique à la formation des chéloïdes puisque ceux-ci sont plus fréquents chez les afro-américains (Thomas *et al.*, 1994). Polo *et al.*, pour leur part, rapportent des concentrations élevées de TGF- $\beta_2$  dans les échantillons sanguins provenant de patients atteints de cicatrices hypertrophiques (Polo *et al.*, 1997). Aussi, une mutation du gène de p53 a été rapportée dans les fibroblastes de chéloïdes avec l'absence de cette mutation dans les fibroblastes de peau normale adjacente à la cicatrice (Ladin *et al.*, 1998). La technique de micro-réseaux d'ADNc a été employée pour comparer l'expression génique dans les cicatrices hypertrophiques, les cicatrices normales et la peau normale (Tsou *et al.*, 2000). Les résultats de cette étude montrent que: 1) 142 gènes sont sur-exprimés et 50 sont sous-exprimés dans les cicatrices normales comparativement à la peau normale; 2) 107 gènes sont sur-exprimés et 71 gènes sont sous-exprimés dans les cicatrices

124 gènes sont sous-exprimés dans les cicatrices hypertrophiques comparativement aux cicatrices normales. Une autre étude, de Dasu *et al.* (2004), a étudié le profil d'expression génique de fibroblastes en provenance de cicatrices hypertrophiques avant et après une stimulation à l'IL-6. Interleukin-6 est une cytokine synthétisée par les fibroblastes, particulièrement ceux issus de chéloïde, et qui altère l'expression de plusieurs gènes et protéines fibroblastiques. L'étude a montré une augmentation de l'expression de 12 gènes et une diminution de l'expression de 14 gènes (Dasu *et al.*, 2004).

Dans le cas des cicatrices hypertrophiques, il apparaît que l'hypoxie, résultat d'une vascularisation anormale, pourrait être en cause. Une autre théorie soutient que l'interruption de la phase de remodelage en serait la raison principale. Puis, une autre hypothèse suggère que l'absence de régression du tissu de granulation serait le résultat d'un processus apoptotique déficient au niveau des myofibroblastes (Amadeu *et al.*, 2003). En effet, des études démontrent que le mécanisme apoptotique est déficient dans les fibroblastes provenant de chéloïdes (Ladin *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2001). Notamment, il survient 22% moins d'apoptose en culture cellulaire de fibroblastes issus de chéloïdes comparativement à ceux provenant de peau normale non lésée (Ladin *et al.*, 1998). Une étude antérieure chez l'homme (Sayah *et al.*, 1999) rapportait la sous-expression de gènes reliés à l'apoptose dans les chéloïdes, ainsi qu'une activité apoptotique réduite des fibroblastes dérivés de chéloïdes versus de cicatrices normales. Ces données suggèrent la possibilité de traiter le chéloïde en stimulant l'apoptose (Sayah *et al.*, 1999).

En résumé, la guérison cutanée problématique provient d'un déséquilibre dans le processus de guérison. Les plaies chroniques auraient un déséquilibre cytokinique et une activité mitogénique réduite empêchant la guérison alors que les cicatrices hypertrophiques ainsi que les chéloïdes auraient une phase proliférative exagérée menant à une fibrose excessive. Un facteur génétique prédisposerait à ces types de cicatrisation pathologiques.

### 3. Guérison cutanée chez le cheval

Les chevaux présentent souvent des difficultés lors de guérison de plaies situées dans la région distale des membres, notamment en ce qui a trait à la résolution de la phase inflammatoire, à la production excessive de tissu de granulation, ainsi qu'à une réépithélialisation et une contraction déficientes. Chez les plus gros chevaux, il y a une propension à l'échec de la guérison contrairement à ce qui est observé chez les poneys. Autant chez le cheval que chez l'homme, un déséquilibre dans la production et l'inhibition de composantes biomoléculaires est vraisemblablement à la base de ce phénomène (Knottenbelt, 1997).

#### 3.1 Plaies thoraciques versus plaies sur les membres

Une guérison rapide et efficace repose en partie sur la réponse inflammatoire suivant un trauma (Knottenbelt, 1997). Une étude de Wilmink *et al.* (2003) a montré que les poneys ont une réponse inflammatoire plus forte mais de plus courte durée que les chevaux. Sachant que les poneys guérissent plus rapidement et harmonieusement que les chevaux, l'étude citée soutient que le déroulement de la phase inflammatoire est déterminant. De plus, le nombre de macrophages dans les blessures situées au cou était significativement plus élevé que dans celles des membres, suggérant une différence dans la réponse inflammatoire selon le site de la blessure (Wilmink *et al.*, 2003). Les plaies appendiculaires subissent une accumulation plus importante de fibrine par rapport aux plaies corporelles. De plus, elles démontrent un patron désorganisé des myofibroblastes qui concorde avec la plus faible contraction notée cliniquement à cet endroit. Selon toute évidence, l'environnement extracellulaire aurait un rôle important à jouer dans l'expression du potentiel contractile des fibroblastes, (Wilmink *et al.*, 2001; Cochrane *et al.*, 2003) malgré qu'il ne soit pas exclu qu'il existe une différence dans la capacité contractile inhérente au fibroblaste (Cochrane *et al.*, 2003).

Un déséquilibre du profil cytokinique pourrait expliquer les différences de guérison entre ces sites anatomiques (Theoret *et al.*, 2001). Plus particulièrement, les taux de TGF- $\beta$  diffèrent entre les plaies de corps et de membre, associés à une concentration décroissante dans les plaies corporelles à partir d'une semaine suivant le

trauma alors qu'il persiste au-delà de deux semaines dans les plaies appendiculaires (Van den Boom *et al.*, 2002). La présence persistante de la protéine TGF- $\beta$ 1 dans les plaies du membre pourrait être liée au développement d'un tissu de granulation exubérant puisque cette cytokine est pro-fibrotique (Theoret *et al.*, 2001).

## **4. Contrôle génique**

Une expression génique anormale pourrait être à l'origine des situations pathologiques rencontrées lors de guérison de plaie. L'étude de Lefebvre-Lavoie *et al.* (2005) a comparé l'expression génique de la peau normale avec celle d'une plaie corporelle chez le cheval, pour définir les gènes différentiellement exprimés. Au total 226 fragments d'ADNc non redondants ont été identifiés, représentant des gènes pouvant jouer un rôle dans la guérison cutanée chez cette espèce (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005).

### **4.1. PECAM1**

#### **4.1.1. Structure**

PECAM1/CD31 est une molécule d'adhésion cellulaire, membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig), exprimée sur les cellules endothéliales ainsi que sur les leucocytes périphériques (Gao *et al.*, 2005). C'est une glycoprotéine transmembranaire avec une masse d'environ 130 kDa, la grandeur variant selon les différents types cellulaires, probablement suite à des différences de glycosylation. Dans sa forme mature le PECAM1 humain est composé d'un large domaine extracellulaire de 574 acides aminés, d'une région membranaire de 19 résidus hydrophobiques et d'un domaine cytoplasmique de 118 acides aminés. Le domaine extracellulaire consiste en 6 unités d'immunoglobulines homologues à la sous-classe C2, similaires à ceux des membres de la superfamille des Ig qui ont pour fonction l'adhésion cellulaire des molécules. PECAM1 pourrait avoir des interactions homophiles et/ou hétérophiles. Les hydrates de carbone constituent environ 40% du poids de la protéine mature et il existe plusieurs sites potentiels pour des glycosylations azotées. Le domaine cytoplasmique contient plusieurs résidus de sérine, thréonine et tyrosine qui pourraient servir comme

sites de phosphorylation après l'activation cellulaire (DeLisser *et al.*, 1993). Ce domaine cytoplasmique comprend les exons 10 à 16 et subit un épissage alternatif générant plusieurs isoformes à propriétés adhésives différentes, selon le type cellulaire. Wang *et al.* (2003) ont montré que le PECAM1 cytoplasmique d'origine humaine subit un épissage alternatif générant six isoformes différents, le PECAM1 pleine longueur étant l'isoforme prédominant détecté dans les tissus humains. Ceci contraste avec leur étude précédente où la forme prédominante dans l'endothélium murin était l'isoforme dont les exons 14 et 15 sont absents. Ils ont aussi remarqué que le patron d'expression des isoformes change durant la formation de capillaires sur Matrigel par les cellules endothéliales. De plus, le fait que différents isoformes puissent être traduits chez l'homme signifierait un rôle spécialisé pour ces derniers (Sheibani *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003). Les résultats d'une étude de l'équipe de Feng *et al.* (2004) abondent dans le même sens; en effet, PECAM1 est localisé sur toute la surface des cellules endothéliales vasculaires de tissus normaux chez la souris. Toutefois, deux anticorps différents ont montré une distribution significativement différente à la surface cellulaire en plus de réagir avec une fraction significative de vésicules et de vacuoles (Feng *et al.*, 2004). En conclusion, on peut présumer que la présence de divers isoformes de PECAM1 gouverne des propriétés différentes.

#### 4.1.2. Distribution

PECAM1 est exprimé sur une variété de cellules. Il a été identifié sur les monocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T, ainsi que sur les thrombocytes et les cellules souches de la moelle épinière. Cependant, il est principalement retrouvé sur les cellules endothéliales, spécifiquement aux jonctions intercellulaires, (DeLisser *et al.*, 1993) où il est normalement exprimé de façon constitutive (Schimmenti *et al.*, 1992; DeLisser *et al.*, 1993). Comme PECAM1 est abondamment retrouvé sur les cellules du compartiment vasculaire, on croit qu'il serait une molécule multifonctionnelle d'adhésion cellulaire vasculaire. De cette façon, il participerait aux processus de migration endothéliale et d'angiogenèse (DeLisser *et al.*, 1993).

### 4.1.3. Expression

PECAM1 est plus fortement exprimé dans les cellules endothéliales confluentes que dans les cellules endothéliales disséminées. À l'aide d'un modèle *in vitro* de ré-endothélialisation Raychaudhury *et al.* (2001) ont observé que le contact cellule-cellule ne déterminait pas à lui seul l'expression de PECAM1. L'intégrité architecturale contrôle la forme et l'étalement de la cellule et est maintenue par des forces mécaniques telles l'adhésion cellule-matrice, l'adhésion cellule-cellule et le cytosquelette. L'évidence suggère que des changements dans l'intégrité architecturale de la cellule soient des régulateurs mécano-chimiques des fonctions cellulaires. Ainsi, l'expression de PECAM1 pourrait être partiellement sous le contrôle d'une régulation mécano-chimique, avec des forces accrues favorisant l'expression et des forces plus faibles amenant la suppression (RayChaudhury *et al.*, 2001).

Dans un modèle de guérison cutanée chez la souris, les taux d'expression génique et protéique de PECAM1 étaient très bas dans la peau non lésée, alors que l'expression de l'ARNm et de la protéine de PECAM1 était induite trois jours suivant le trauma. À six jours suivant la blessure, l'ARNm et la protéine de PECAM1 étaient toujours fortement exprimés mais à 12 jours, seulement l'expression protéique persistait (Galeano *et al.*, 2004).

Il y a normalement expression constitutive de PECAM1 dans les cellules mononucléaires et les cellules endothéliales sinusoidales du foie. Dans un modèle d'inflammation hépatique causée par une injection de CCl<sub>4</sub> chez des rats, l'expression de PECAM1 dans les cellules mononucléaires diminue dans les 12-24h suivant l'injection et revient à un taux normal environ 48-60h plus tard. De plus, un traitement *in vitro* au TNF $\alpha$  diminue la quantité de transcrit de PECAM1 dans les cellules mononucléaires ainsi que dans les cellules endothéliales sinusoidales (Neubauer *et al.*, 2000).

#### 4.1.4. Fonctions biologiques potentielles

##### 4.1.4.1. Apoptose

PECAM1 contribuerait à la résistance des cellules hématopoïétiques à l'apoptose, par inanition. En effet, PECAM1 agit à titre d'inhibiteur de l'apoptose dépendant des mitochondries par l'entremise de liaisons à diverses kinases et phosphatases, incluant le phosphatidylinositide-3-kinase qui phosphoryle Akt, qui à son tour, contrôle positivement la transcription et la fonction de protéines anti-apoptotiques. Ces dernières permettent la survie cellulaire en sauvegardant contre l'apoptose mitochondriale (Zhou *et al.*, 1999).

##### 4.1.4.2. Migration

L'expression de *PECAM1* peut moduler le processus de migration endothéliale lors de la guérison de plaie; cependant, les études à cet effet proposent des conclusions contradictoires. Les cellules endothéliales déficientes en PECAM1 ont une motilité cellulaire et une formation d'extensions cytoplasmiques augmentées mais une migration amoindrie lors de la guérison tissulaire (Gratzinger *et al.*, 2003). Pour leur part, les fibroblastes dermiques ayant subi une transfection avec *PECAM1* sont plus petits, semblent adhérer les uns aux autres en formant des agrégats, et migrent plus lentement (Schimmenti *et al.*, 1992). À l'inverse, l'usage d'anticorps bloquants cause aussi une diminution de migration dans un modèle de guérison ainsi qu'une diminution de la motilité cellulaire, *in vitro*, chez des cellules endothéliales provenant de cordon ombilical humain (Cao *et al.*, 2002). Bref, l'expression de PECAM1 augmente la migration cellulaire sans nécessairement en augmenter la motilité. Il est postulé que ces effets sur la migration endothéliale lors de guérison tissulaire dépendraient de la capacité de PECAM1 à supporter le signal S1P/RhoGTP afin de diriger spatialement et coordonner l'activation de la cascade signalétique G alpha (Gratzinger *et al.*, 2003). Il est important de noter que la diapédèse n'est pas sous le contrôle exclusif de PECAM1. En effet, ce processus serait plutôt contrôlé séquentiellement par deux molécules distinctes, soit, PECAM1 et CD99 (Schenkel *et al.*, 2002).

#### 4.1.4.3. Inflammation

Il a été démontré que des anticorps contre PECAM1 ont un effet néfaste sur la réponse inflammatoire aiguë (Vaporciyan *et al.*, 1993; Bogen *et al.*, 1994). Qui est plus, Solowiej *et al.* (2003) ont montré que des souris déficientes en PECAM1 ont une infiltration neutrophilique diminuée dans un modèle d'inflammation chronique (implants sous-cutanés), apparemment lié spécifiquement au PECAM1 d'origine endothéliale. Plus spécifiquement, il apparaît qu'une réduction d'angiogenèse est corrélée à une diminution neutrophilique chez les souris déficientes en PECAM1. Ces études concluent que l'absence de PECAM1 endothélial résulte en une diminution de l'angiogenèse limitant ainsi l'arrivée de leucocytes au site d'implant (Solowiej *et al.*, 2003).

#### 4.1.4.4. Angiogenèse

Williams *et al.* (2006) ont montré une augmentation de PECAM1 dans deux différents modèles d'angiogenèse, signifiant que cette augmentation représente une réponse angiogénique commune des cellules endothéliales (Williams *et al.*, 2006). PECAM1 aurait aussi un rôle à jouer dans le processus d'angiogenèse tumorale, des anticorps contre PECAM1 inhibant la croissance ainsi que la vascularisation de tumeurs sous-cutanées chez la souris (Zhou *et al.*, 1999).

PECAM1 stimule la formation de tubes *in vitro* (O'Brien *et al.*, 2004). Selon Matsumura *et al.* (1997) la tubulogénèse dépendrait de l'interaction du PECAM1 et de la cadherine 5 avec l'actine filamenteuse; le PECAM1 et la cadherine 5 pouvant se substituer l'un à l'autre pour contrôler l'alignement de l'actine filamenteuse, nécessaire à la formation des tubes. PECAM1 serait ainsi très important à l'arrangement tridimensionnel des vaisseaux mais aussi pour la migration endothéliale (Matsumura *et al.*, 1997). Toutefois, Zhou *et al.* (1999) ont trouvé que des anticorps contre PECAM1 inhibent la formation de tubes sur Matrigel et ce, sans influence sur la cadherine 5 (Zhou *et al.*, 1999).

Duncan *et al.* (1999) démontrèrent que les souris PECAM1 déficientes sont viables et ont un développement vasculaire normal, suggérant que PECAM1 n'est pas essentiel à la vasculogénèse. Cependant elles ont un transit anormal des leucocytes polymorphonucléaires au travers de la membrane vasculaire basale avec une



accumulation de leucocytes polymorphonucléaires à la membrane basale périvasculaire. Un nombre similaire de leucocytes migre dans la cavité péritonéale de souris soit de type sauvage ou PECAM1-déficientes suite à une péritonite aiguë. La création de souris PECAM1 déficientes confirme que PECAM1 est impliqué dans la migration transendothéliale des neutrophiles au intervenant dans le passage à travers la membrane basale. Toutefois PECAM n'est pas essentiel au processus de migration leucocytaire et au développement vasculaire, impliquant l'existence de mécanismes compensatoires chez la souris (Duncan *et al.*, 1999).

D'autre part, les thrombi formés chez des souris PECAM1 déficientes seraient plus gros, se formant plus rapidement et étant plus stables que ceux des souris contrôles. PECAM1 serait donc impliqué dans la régulation négative de la formation de thrombus. Les plus gros thrombi chez les souris invalidées seraient dus à l'hyper-activation plaquettaire plutôt qu'à une augmentation de l'activation de l'endothélium ou du système de coagulation. L'étude de Mahooti *et al.* (2000) qui indique que les souris PECAM1 déficientes auraient un défaut endothélial résultant en un saignement excessif, permet de supposer un rôle à la fois positif et négatif de PECAM1 dans la formation de thrombus. Cependant, l'étude de Vollmar *et al.* (2001) rapporte des temps de saignement normaux chez la souris invalidée pour PECAM-1 et montre que *in vivo*, PECAM1 n'est pas critique à la formation du thrombus suite à une blessure endothéliale.

En résumé, PECAM-1 est une molécule d'adhésion cellulaire exprimée principalement sur les cellules endothéliales. Il est un facteur angiogénique qui module la migration endothéliale et favorise la vasculogénèse. Il détient aussi des propriétés anti-apoptotiques.

## 4.2 PI10

La superfamille des inhibiteurs de serines protéinases (serpines) est caractérisée par une structure tertiaire bien conservée consistant en trois feuillets- $\beta$  et huit ou neuf hélices- $\alpha$ . La portion critique de la molécule est la boucle réactive connectant les feuillets- $\beta$  A et C et qui, la plupart du temps, sert d'appât pour les serines protéinases (Bartuski *et al.*, 1997). Chez l'Homme, les serpines représentent 10% des protéines

(Bartuski *et al.*, 1997). Chez l'Homme, les serpinines représentent 10% des protéines plasmatiques. Elles sont retrouvées aux plans intracellulaire et extracellulaire. Les serpinines sont des protéines régulatrices clés de plusieurs processus biologiques importants comme la fibrinolyse (inhibiteur d'activateur de plasminogène de types 1 et 2 (PAI1 et PAI2);  $\alpha$ 2-antiplasmine (PLI), la coagulation (antithrombine III (AT3)), la différenciation cellulaire (PAI1; protéinase nexine 1 (PI7)), la suppression tumorale (maspin (PI15); PAI2), l'apoptose (PI17) et la motilité cellulaire (PAI2; PI5) (Potempa *et al.*, 1994).

Plusieurs membres de la superfamille ne jouissent pas, cependant, de cette capacité inhibitrice, par exemple, l'angiotensinogène (AGT) et l'ovalbumine (PI8). L'ovalbumine représente le prototype d'une famille de protéines incluse dans la superfamille des serpinines. Ces dernières ont plusieurs structures en commun, dont l'absence de la séquence typique représentée par le signal clivable en position aminoterminal (Riewald et Schleef, 1995).

Riewald et Schleef (1995) ont cloné l'inhibiteur de protéinase 10 (PI10), aussi surnommé bomapine, à partir de moelle osseuse humaine. Ils ont trouvé qu'il s'agissait d'une serpinine typique détenant 44 des 51 résidus préalablement déterminés comme cruciaux pour la structure tertiaire des serpinines. L'absence de la séquence signal dans la séquence codante de PI10 (Riewald et Schleef, 1995; Riewald *et al.*, 1998) en combinaison avec un signal de localisation nucléaire dans la boucle interhélicale C-D (Chuang et Schleef, 1999) en fait un inhibiteur présent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules. L'expression génique de PI10 chez l'Homme a été montrée par hybridation Northern dans les tissus suivants: cœur, cerveau, placenta, poumons, foie, muscles squelettiques, reins, pancréas, rate, thymus, prostate, testicules, ovaires, petit intestin, côlon et leucocytes sanguins périphériques. Cependant, aucun transcrite n'a pu être trouvé dans ceux-ci, suggérant que PI10 est exprimé fortement et spécifiquement dans la moelle osseuse chez l'Homme (Riewald et Schleef, 1995). Cette expression restreinte insinue que cette serpinine jouerait un rôle dans la régulation de l'activité des protéinases durant l'hématopoïèse, un processus nécessitant la régulation de la viabilité, de la croissance et de la différenciation cellulaires (Schleef et Chuang, 2000). Cependant, l'étude de Lefèbvre-Lavoie *et al.* (2005) a montré une augmentation de l'expression du

gène de PI10 dans le bord de plaie durant la guérison cutanée chez le cheval, attribuant ainsi un rôle à PI10 au cours de la cicatrisation. D'autre part, l'ARNm de PI10 est constitutivement exprimé dans les lignées cellulaires THP-1 et AML-193. Le traitement de ces dernières avec des agents qui induisent une différenciation monocytique cause une diminution de l'ARNm et de la protéine de PI10, conférant un rôle à cette serpine dans la régulation de l'activité des protéinases durant les premiers stades de la différenciation cellulaire (Riewald *et al.*, 1998).

Par ailleurs, PI10 est un exemple de gène spécifiquement associé au cancer (Ulger *et al.*, 2003). Il inhibe la mort cellulaire induite par le TNF- $\alpha$  (Schleef et Chuang, 2000) et l'étude de Shioji *et al.* (2005) suggère que les variations de type « faux-sens » dans la séquence de PI10 amènent d'importants risques de cancer de la prostate, les qualifiant donc d'oncogènes. De plus, PI10 est exprimé à des concentrations élevées chez les patients souffrant de leucémie myéloïde aiguë ou de leucémie myélomonocytaire chronique (Schleef et Chuang, 2000).

En résumé, PI10 est une serpine inhibitrice exprimée fortement et spécifiquement dans la moelle osseuse chez l'Homme. Cette serpine inhiberait la mort cellulaire en plus de jouer un rôle dans la régulation des protéinases.

### **4.3 PEDF**

#### **4.3.1. Structure**

Le facteur dérivé de l'épithélium pigmenté (PEDF) est une glycoprotéine de 418 acides aminés et 50 kDa (Ren *et al.*, 2005), identifié dans l'oeil comme une protéine extracellulaire (Becerra, 1997). Chez la souris et l'Homme, le gène *PEDF* est d'environ 13 kb et comporte 8 exons (Singh *et al.*, 1998). Bien que *PEDF* partage une forte homologie de séquence et de structure avec les membres de la famille des serpines, il n'est pas inhibiteur de sérine protéinase (Becerra *et al.*, 1993; Becerra *et al.*, 1995). Il ferait ainsi partie des serpines non-inhibitrices. La boucle réactive caractéristique des serpines étant présente mais pas nécessaire à l'activité neurotrophilique de PEDF. Ce

Aymerich *et al.*, 2001) mais il est aussi possible que ce soit par liaison aux intégrines (Ren *et al.*, 2005).

#### 4.3.2. Distribution et expression

PEDF est sécrété par les cellules épithéliales pigmentées de la rétine de plusieurs espèces animales. La protéine ainsi que l'ARNm de PEDF se retrouvent en concentration significative dans le système nerveux. PEDF est aussi exprimé dans divers tissus dont les muscles squelettiques, les os, le cœur, le placenta et le foie (Tombran-Tink *et al.*, 1996), alors que des analyses Northern montrent la présence du transcrite de *PEDF* dans plusieurs tissus de souris adultes, le foie présentant le taux d'expression le plus élevé (Singh *et al.*, 1998). Chez l'Homme, l'ARNm ainsi que la protéine de PEDF ont été détectés dans le derme (Francis *et al.*, 2004) et la protéine se retrouve en concentration notable dans le sang (Petersen *et al.*, 2003).

Dans un modèle expérimental de néovascularisation rétinale chez le rat, une baisse du taux d'expression d'ARNm précède d'environ 2 jours celle de la protéine de PEDF (Gao *et al.*, 2001). Cette diminution d'ARNm est d'approximativement la même étendue que celle de la protéine (Gao *et al.*, 2001). Pareillement, la concentration protéique de PEDF corrèle bien avec son expression d'ARNm durant le développement hépatique chez le rat (Sawant *et al.*, 2004).

Une diminution de l'expression de PEDF en fonction de l'âge a été démontrée. Lorsqu'une culture primaire de cellules épithéliales de pigment rétinale arrive à la sénescence, la concentration protéique de PEDF diminue (DiPaolo *et al.*, 1995; Tombran-Tink *et al.*, 1995; Hjelmeland *et al.*, 1999), le même phénomène a été rapporté *in vivo* (Francis *et al.*, 2004). De plus, l'expression de PEDF est sensible aux androgènes et à l'hypoxie. Des concentrations croissantes ( $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-7}$  M) de dihydrotestostérone (DHT) ont diminué la sécrétion de PEDF de 10%, 35% et 47%, respectivement, par des cellules stromales de prostate, en culture (Doll *et al.*, 2003). À l'inverse, une baisse d'androgènes stimule la production de PEDF lors de tumeur de la prostate chez l'homme (Doll *et al.*, 2003).

l'inverse, une baisse d'androgènes stimule la production de PEDF lors de tumeur de la prostate chez l'homme (Doll *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les rétines de souris exposées à une hyperoxémie ont affiché une forte coloration immunohistochimique pour PEDF tandis que celles de souris témoins n'ont montré aucune coloration. En revanche, aucune différence de la concentration de l'ARNm n'a été détectée entre des cellules de tumeurs rétinoblastomales mises en hypoxie et des cellules contrôles, suggérant que la régulation hypoxique a lieu lors de la traduction ou suite à celle-ci (Dawson *et al.*, 1999). Ainsi, PEDF régulariserait la croissance des vaisseaux sanguins oculaires en créant un environnement propice à l'angiogenèse en présence d'hypoxie, mais défavorable en présence de concentrations en oxygène normales ou élevées (Dawson *et al.*, 1999). Par ailleurs, un traitement hypoxique a diminué de 97% la quantité de PEDF sécrété par des cellules prostatiques stromales mais a augmenté de 15% la sécrétion par les cellules prostatiques épithéliales (Doll *et al.*, 2003).

### **4.3.3. Fonctions**

On attribue à PEDF un effet principalement autocrine sur les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (Tombran-Tink et Barnstable, 2003) mais il aurait aussi des effets paracrines vu sa présence dans le sang ainsi que sa production marquée dans le foie. Les souris déficientes en PEDF souffrent d'altérations morphologiques et d'une densité microvasculaire augmentée de la rétine, ainsi que d'une perte des cellules ganglionnaires, d'une augmentation de la croissance stromale des vaisseaux et d'une hyperplasie des cellules épithéliales d'organes tels que la prostate et le pancréas (Doll *et al.*, 2003). PEDF aurait un rôle dans plusieurs phénomènes dont l'angiogenèse, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la protection neuronale et l'inflammation.

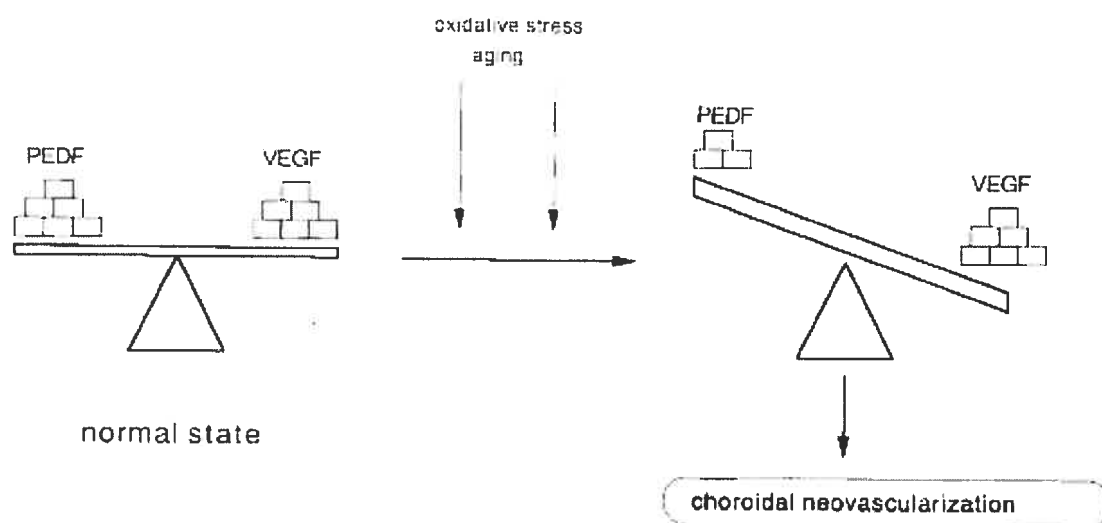
#### **4.3.3.1. Angiogenèse**

Un rôle anti-angiogénique fut conféré à PEDF quand Dawson *et al.* (1999) ont montré que c'est un facteur anti-angiogénique naturel, potentiellement le plus efficace trouvé à ce jour. De plus, l'activité anti-angiogénique de PEDF est réversible et sélective puisqu'elle cible les vaisseaux en construction tout en épargnant les plus anciens (Ren *et*

*al.*, 2005). *In vitro*, PEDF inhibe la migration de cellules endothéliales de manière dose-dépendante avec une valeur médiane de 0,4 nM. Cette protéine surclasse ainsi les autres inhibiteurs naturels d'angiogenèse tels l'angiostatine, la TSP-1 et l'endostatine. En fait, PEDF arrive à contrer l'effet de nombreux inducteurs angiogéniques incluant le PDGF, le VEGF, l'interleukine-8 (IL-8), le FGF de type acide (aFGF) ainsi que l'acide lysophosphatidique (Dawson *et al.*, 1999). À des doses de 1,0 nM et plus, PEDF inhibe également la prolifération des cellules endothéliales capillaires, induite par le bFGF (Dawson *et al.*, 1999). Il peut aussi inhiber la migration, la prolifération et même la perméabilité des cellules endothéliales induites par VEGF (Ren *et al.*, 2005). Puisque PEDF est présent en grande concentration dans les régions avasculaires de l'œil et que les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine sécrètent des inhibiteurs d'angiogenèse, cette découverte n'est pas inattendue (Tombran-Tink et Barnstable, 2003).

La neutralisation de PEDF, en l'absence d'inducteurs angiogéniques, stimule l'invasion de nouveaux vaisseaux cornéens chez le rat. Cependant, les anticorps contre PEDF ne stimulent pas, à eux seuls, la migration des cellules endothéliales *in vitro*. Il est donc postulé que le blocage du PEDF démasque l'activité angiogénique endogène de la cornée (Dawson *et al.*, 1999). En retour, PEDF biochimiquement purifié ainsi que sous forme recombinée inhibe efficacement la néovascularisation cornéenne chez le rat (Dawson *et al.*, 1999).

L'hypoxie est un stimulus important de l'angiogenèse. Sous des conditions hypoxiques en culture, la sécrétion de PEDF est diminuée alors que l'expression de VEGF, un facteur angiogénique des plus efficaces, est augmentée (Dawson *et al.*, 1999). Ces résultats ont été soutenus récemment *in vivo* alors qu'une diminution de la concentration en PEDF a été signalée dans les yeux de patients atteints de rétinopathie diabétique proliférative et de dégénération maculaire, des affectations caractérisées par une augmentation significative de la vascularisation (Ogata *et al.*, 2001a; Ohno-Matsui *et al.*, 2001; Spranger *et al.*, 2001; Holekamp *et al.*, 2002; Ogata *et al.*, 2002a). Ces études indiquent une corrélation directe entre PEDF et la néovascularisation oculaire en plus de souligner la réciprocité entre PEDF et VEGF lors de croissance incontrôlée des vaisseaux sanguins de l'œil (voir figure 2) (Gao *et al.*, 2001; Ohno-Matsui *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2002b).



**Figure 2.** Schéma montrant qu'un équilibre dynamique entre VEGF et PEDF est essentiel pour le comportement des cellules choroïdales endothéliales. Un stress oxydatif peut changer l'équilibre entre VEGF et PEDF et occasionner une néovascularisation choroïdale (Ohno-Matsui *et al.*, 2001).

Il est intéressant de noter la présence de PEDF lors du développement embryonnaire, quand la vasculogénèse et la différenciation neuronale ont lieu. Comme PEDF semble contrôler diverses voies de transduction, son activité est possiblement spécifique au tissu et/ou dépend de l'expression de plus d'un récepteur (Tombran-Tink et Barnstable, 2003). Par exemple, PEDF semble jouer un rôle clé, de concert avec VEGF, dans la conception et le maintien de l'architecture vasculaire du foie (Sawant *et al.*, 2004) et pourrait contrôler la vascularisation et la masse du pancréas ainsi que de la prostate (Doll *et al.*, 2003). Cependant, les concentrations de PEDF durant le développement de la rétine suivent un patron caractéristique d'un inhibiteur d'angiogénèse. Lors de la vasculogénèse, il n'y a pas ou peu de coloration immunohistochimique pour le PEDF contrairement au temps où la néovascularisation se termine (Dawson *et al.*, 1999).

Le potentiel anti-tumoral de PEDF, lié à ses effets neuroprotecteurs et anti-angiogéniques, fut récemment mis à l'épreuve. L'injection d'un plasmide codant PEDF a inhibé la croissance de tumeurs dans un modèle de souris athymiques (Matsumoto *et al.*, 2004). Une autre étude conduite chez la souris athymique a montré que l'injection directe de PEDF promeut la différenciation de neuroblastomes primitifs en un type moins malin, moins bien vascularisé, et qui produit plus de PEDF (Crawford *et al.*, 2001). D'autre part, un milieu conditionné par des cellules tumorales hypoxiques possède un pouvoir angiogénique plus grand qu'un milieu conditionné par des cellules tumorales normales. La neutralisation de PEDF accroît le pouvoir angiogénique du milieu conditionné par les cellules tumorales normales jusqu'à un niveau comparable à celui caractérisant le milieu hypoxique (Dawson *et al.*, 1999).

#### 4.3.3.2. Apoptose

Les résultats de Hutchings *et al.* (2002) montrent que PEDF a des effets opposés sur les cellules endothéliales de différents phénotypes, inhibant ou non leur croissance. Cependant, les deux études suivantes montrent seulement un effet de réduction de la prolifération. Les cellules endothéliales en prolifération sont les seules cibles identifiées jusqu'à maintenant où PEDF promeut la mort cellulaire programmée. Le mécanisme par lequel PEDF limite la croissance des vaisseaux sanguins semble impliquer l'activation de la cascade apoptotique Fas/FasL, particulièrement sensible chez les cellules endothéliales bordant les nouveaux vaisseaux (Volpert *et al.*, 2002). Chez les cellules proliférantes, l'expression de PEDF est intimement liée au cycle cellulaire. En effet, PEDF est induit spécifiquement dans les cellules entamant la phase G<sub>0</sub>; de plus, via un effet paracrine, il réduit le nombre de cellules s'engageant dans la phase S (Hjelmeland *et al.*, 1999). L'effet net est donc une diminution de la proportion de cellules qui effectuent le cycle cellulaire et par le fait même, une réduction de la prolifération (Tombran-Tink *et Barnstable*, 2003).



#### 4.3.3.3. Protection des neurones

PEDF est un facteur de survie neurotrophique efficace pour les cellules granulaires cérébrales en culture (Taniwaki *et al.*, 1995). Contrairement à d'autres facteurs de croissance, PEDF ne semble pas mitogénique mais promeut plutôt la différenciation cellulaire (Tombran-Tink et Barnstable, 2003). En effet, il peut même inhiber la croissance et la prolifération des microglies et des astrocytes (Sugita *et al.*, 1997). PEDF prévient l'apoptose des neurones *in vitro* (Taniwaki *et al.*, 1995); (Araki *et al.*, 1998; Bilak *et al.*, 1999; DeCoster *et al.*, 1999; Houenou *et al.*, 1999) et *in vivo* (Bilak *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 1999; Houenou *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2001; Ogata *et al.*, 2001b).

#### 4.3.3.4. Anti-inflammatoire

Récemment, Zhang *et al.* (2006) ont montré qu'une diminution de l'expression de PEDF induisait une réponse inflammatoire, suggérant PEDF comme facteur anti-inflammatoire endogène. De plus, cette activité anti-inflammatoire corrèle bien avec sa capacité de réduire la perméabilité vasculaire de la rétine, ce qui porte à croire qu'une relation causale existe entre ces deux phénomènes (Zhang *et al.*, 2006). Finalement, PEDF bloque *in vitro* l'effet mitogénique du facteur stimulant de colonie de granulocyte-macrophage (GM-CSF), une cytokine pro-inflammatoire (Tombran-Tink et Barnstable, 2003).

#### 4.3.4. Usages cliniques

PEDF a le potentiel de devenir un agent thérapeutique d'une grande valeur clinique, grâce aux nombreux avantages qui le caractérisent (Tombran-Tink et Barnstable, 2003). Premièrement, il ne semble pas activer un gène de résistance, ce qui lui confère une efficacité à long-terme dans les thérapies anti-angiogéniques. Deuxièmement, son administration ne s'avère pas toxique. Troisièmement, grâce à son activité neurotrophique, PEDF sait préserver les neurones de dommages pouvant être causés par les maladies vasculaires du système nerveux (Ren *et al.*, 2005).

Quatrièmement, PEDF est sécrété sous une forme stable, peu susceptible aux protéinases du milieu extracellulaire. Finalement, PEDF peut être administré par diverses voies.

En résumé, PEDF est une serpine non-inhibitrice dont l'expression diminue avec l'âge. Cette serpine, en plus d'être un agent anti-angiogénique puissant, promeut l'apoptose. De plus, elle est un facteur de survie neurotrophique ainsi qu'un facteur anti-inflammatoire.

**Tableau I. Synthèse du contrôle génique**

<b>Gène</b>	<b>Superfamille</b>	<b>Lieu d'expression majoritaire connu</b>	<b>Fonctions biologiques connues</b>
<b>PECAM1</b>	Immunoglobulines (molécule d'adhésion cellulaire)	Cellules endothéliales	-angiogénique -anti-apoptotique -modulation de la migration endothéliale
<b>PI10</b>	Serpine (inhibitrice)	Moelle osseuse	-anti-apoptotique - régulation des protéinases
<b>PEDF</b>	Serpine (non-inhibitrice)	Foie	-anti-angiogénique -promouvoit l'apoptose -neurotrophique -anti-inflammatoire

## 5. Hypothèse et objectif

Lefebvre-Lavoie *et al.* (2205) ont comparé l'expression génique dans la peau normale et dans des plaies âgées de sept jours via l'hybridation soustractive suppressive (HSS) afin d'identifier les gènes exprimés différemment durant la guérison chez le cheval. Cette étude a identifié 226 ADNc non-redondants dont l'expression était augmentée durant la guérison tissulaire chez le cheval. De ce nombre, trois fragments ADNc ont été choisis puisqu'ils représentent un intérêt potentiel dans la guérison de plaies. L'hypothèse générale de cette étude sous-tend que les gènes pour le « platelet endothelial cell adhesion molecule 1 » (PECAM1), la « serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 10 » (PI10) et le « pigment epithelium derived factor »

(PEDF) possèdent une expression temporelle caractéristique lors de la guérison cutanée normale chez le cheval et qui diffère selon la localisation de la plaie. Ainsi, les objectifs de travail ont été initialement de caractériser l'ADNc pleine longueur correspondant à ces trois gènes chez l'équin puis de déterminer l'expression temporelle en ARNm lors de la guérison cutanée chez le cheval. Pour atteindre le premier objectif, la technique de Northern virtuel jumelée au clonage de l'ADNc par l'établissement d'une génothèque d'ADNc ont été utilisés. Pour ce qui est du deuxième objectif, l'ARN total a été extrait des échantillons de peau normale et de plaies prélevés aux membres et au thorax à 1,2,3,4 et 6 semaines suivant la création des plaies. Les ARN totaux pour chaque échantillon ont été transformés en ADNc à l'aide de la trousse « SMART PCR cDNA synthesis » (Clontech Lab Inc, Palo Alto, CA, USA) puis l'expression a été comparée par RT-PCR semi-quantitatif.

# Méthodologie

## **1. Modèle expérimental**

La portion *in vivo* de l'étude fut effectuée antérieurement (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005; Lepault *et al.*, 2005); les échantillons prélevés furent utilisés pour les travaux de maîtrise.

### **1.1 Chevaux**

Six juments âgées de 2 à 3 ans, de race Standardbred ont été utilisées pour effectuer la prise d'échantillons. Un examen général incluant des tests hématologiques et biochimiques a été effectué deux semaines avant l'étude pour s'assurer de la bonne santé des chevaux. Les tests ont révélé que les animaux étaient tous en bonne santé. Les juments ont été vaccinées contre : la rage, le tétanos, l'influenza équine et le virus du Nil occidental au moment des tests sanguins. Les juments ont été hébergées en stalle à la ferme du Centre de Recherche en Reproduction Animale (CRRRA) et ont reçu une alimentation en foin et en eau *ad libitum*.

Le protocole d'expérimentation a respecté 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). Il a été approuvé par le Comité de déontologie animale de la Faculté de médecine vétérinaire.

### **1.2 Procédure chirurgicale**

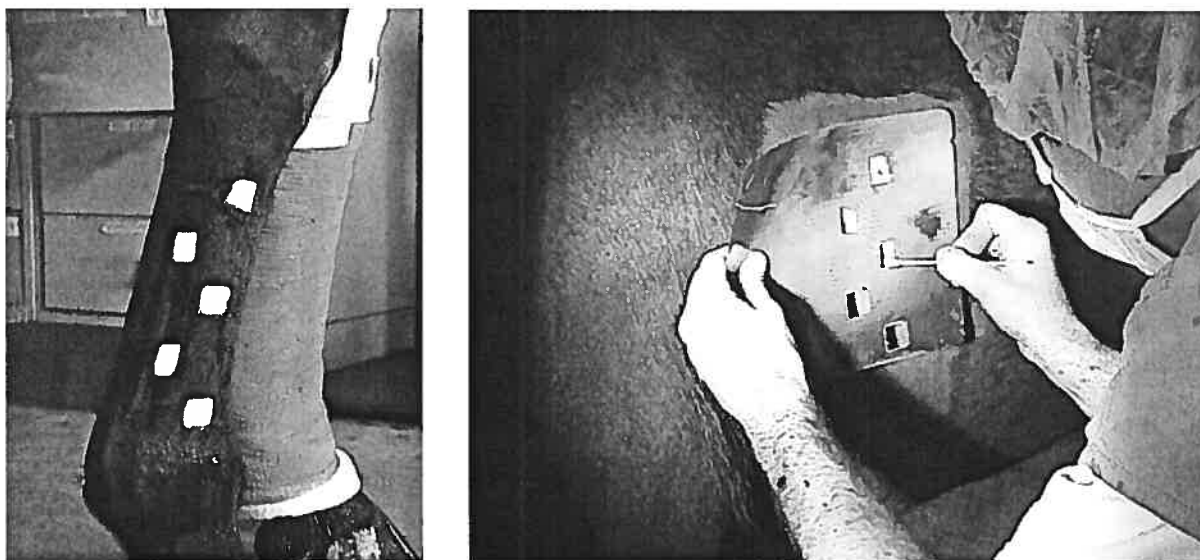
Chaque cheval était placé dans un travail puis soumis à une sédation avec du chlorhydrate de détomidine (Dormosedan® 10 mg/mL) à raison de 4 mg par voie intraveineuse (I.V.) et de tartrate de butorphanol (Torbugesic® 10 mg/mL) 10 mg par voie I.V.

Trois sites de chirurgie étaient déterminés comme suit :

- L'aspect dorso-latéral de la région métacarpienne droite;
- L'aspect dorso-latéral de la région métacarpienne gauche;
- L'aspect latéral du thorax (un seul côté, choisi aléatoirement mais de façon égale : trois juments avaient les plaies sur le côté gauche, les trois autres sur le côté droit.)

Chaque site était tondu puis nettoyé au moyen d'un «scrub» chirurgical avant la chirurgie. Une anesthésie locale au chlorhydrate de lidocaïne (Lurocaïne® 20 mg/mL) était effectuée à raison de 20 mL par site.

Cinq plaies cutanées de pleine épaisseur mesurant 2,5 cm X 2,5 cm étaient créées à l'aide d'un bistouri à chacun des trois sites. Les plaies étaient disposées en rangée verticale et décalées avec un espacement de 1,5 cm à l'horizontale ainsi qu'à la verticale. Le tout était standardisé à l'aide d'un prototype stérile (voir figure 3).



**Figure 3. Emplacement des lésions créées sur les membres et sur le thorax.**

### 1.3 Suivi post-opératoire

Des bandages temporaires ont été placés sur les plaies des membres afin de minimiser l'hémorragie. Ils ont été retirés environ deux heures après l'intervention chirurgicale. Les plaies ont guéri par seconde intention et aucun médicament n'a été administré.

Pour simuler une guérison avec fibroplasie excessive (« bouton de chair »), un membre choisi aléatoirement a été mis sous bandage chez chacune des juments. Le bandage était par la suite changé aux 2 à 3 jours, les plaies de l'autre membre et du thorax restant exposées à l'air libre. Chaque changement de bandage était accompagné d'un examen des juments et des plaies pour déceler tout inconfort ou début d'infection.

#### **1.4 Prise d'échantillons**

Préalablement à chaque biopsie, les juments ont reçu une sédation et une anesthésie locale telles que lors de la chirurgie initiale, puis, les plaies ont été nettoyées avec une solution saline.

Les échantillons de peau normale ont été obtenus lors de la création des plaies. Par la suite, aux semaines 1, 2, 3, 4 et 6, une plaie par site par jument était biopsiée à l'aide d'un «punch» à biopsie de 8mm de diamètre (Acu•Punch; Acuderm Inc., Ft Lauderdale, FL, USA). La biopsie était de pleine épaisseur et se situait en bordure de la plaie de façon à inclure une bande cutanée périphérique de 3 à 4 mm d'épithélium en migration et une bande de 3 à 4 mm de tissu de granulation. Les biopsies ont été prises de la plaie la plus distale à la plus proximale afin que l'inflammation causée par la biopsie n'affecte pas les plaies à prélever subséquentement.

Les biopsies ont ensuite été immédiatement déposées dans un contenant sur glace pour être rincées avec de la saline stérile à 4°C. Le surplus de liquide a été épongé à l'aide d'un papier absorbant. Par la suite les biopsies ont été emballées dans du papier d'aluminium et plongées dans l'azote liquide pour être transférées dans un congélateur - 80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

## **2. Caractérisation de l'ADN complet**

### **2.1 Obtention des sondes radioactives**

#### **2.1.1 Préparation des sondes**

Les sondes ont été générées à partir des ADNc issu d'une étude antérieure qui visait à identifier les gènes induits lors de la guérison cutanée chez le cheval par la méthode d'hybridation soustractive suppressive (HSS) (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005). Une amplification par PCR de 28 cycles (94°C : 15 sec; 68°C : 30 sec; 72°C : 90 sec) utilisant 1 µl de l'ADNc a été faite pour chaque sonde en utilisant : 5µl du tampon de PCR 10X, 2 µl Nested PCR primer 1 (10 µM), 2 µl Nested PCR primer 2R (10 µM), 1 µl dNTP mix (10 mM), 38 µl d'eau stérile et 1µl d'ADN polymérase Advantage<sup>TM</sup> 2 (BD Biosciences Clontech) pour un volume final de la réaction de 50 µl. Les réactions de PCR ont été effectuées dans l'appareil Mastercycler® ep (Eppendorf) puis, les amplicons ont été séparés sur gel d'agarose 2% TAE 1X pour s'assurer qu'un seul fragment d'ADN soit amplifié et d'en définir son poids moléculaire (voir tableau I pour la séquence des amorces). L'ADNc a alors été extrait du gel d'agarose par la méthode QIAquick (Gel Extraction Kit, Qiagen Inc) et élué dans un volume final d'environ 30 µl.

**Tableau II. Liste des amorces utilisées pour l'amplification par PCR**

Amorce	Séquence
Nested PCR primer 1	5' -TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
Nested PCR primer 2R	5' -AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
PCR primer II A	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

La concentration d'ADN a été estimée sur une plaque de bromure d'éthidium (Sambrook et Russell, 2001) avant de procéder au marquage de la sonde.

### 2.1.2 Marquage des sondes par amorces aléatoires

Les sondes (100 ng) ont été marquées au P<sup>32</sup> par la méthode d'amorces aléatoires en utilisant la trousse « Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labelling Systems » (Amersham Biosciences) à l'aide de 40 à 50 µCi de [α-P<sup>32</sup>]-dCTP (Perkin Elmer Life Science Inc,

Boston, MA, USA). La sonde radiomarquée a été purifiée, par affinité, de la radioactivité non-incorporée (QIAquick Nucleotide Removal Kit, Qiagen Inc).

## **2.2 Détermination du poids moléculaire de l'ADNc pleine longueur par Northern virtuel**

### **2.2.1 Préparation des membranes**

Une amplification par PCR comprenant une activation à 95°C, 1 min suivit de 19 cycles (95°C 5 sec, 65°C 5 sec, 68°C 6 min) a été réalisée avec 1 µl de l'ADNc du pool d'échantillons de thorax à 1 semaine, selon les modalités suivantes : 10 µl du tampon de PCR 10X Advantage, 2 µl PCR-primer II A (12µM), 2 µl de dNTP mix (10 mM), 83 µl d'eau stérile et 2 µl d'ADN polymérase Advantage<sup>TM</sup> 2 (BD Biosciences Clontech) pour un volume final de 100 µl. Les réactions de PCR ont été effectuées dans l'appareil Mastercycler® ep (Eppendorf) puis, les produits ont été conservés à 4°C. Le produit de PCR a ensuite été extrait au phénol-chloroforme, et concentré par précipitation (Sambrook et Russell, 2001). La totalité du produit PCR a été séparée sur un gel d'agarose 0.8% TBE 0,5X pendant 4 à 5 hr à 80 volts (Sambrook et Russell, 2001) en parallèle à une échelle de poids moléculaire (1-Kb DNA ladder, Invitrogen). Suite à la migration, une règle a été placée parallèlement au gel d'agarose et une image a été saisie à l'aide de l'AlphaImager<sup>TM</sup>2200 (Alpha Innotech). Le gel a été lavé pendant 70 min dans du TBE 0,5X. Les ADNc ont été transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>; Amersham Biosciences) par transfert capillaire à l'aide d'un tampon alcalin (0.4N NaOH + 1M NaCl (Sambrook et Russell, 2001)) pendant 16 hr. Suite au transfert, les ADNc ont été fixés à la membrane par un traitement aux UV (2 X 150 mJ; SpectroLinker<sup>TM</sup> XL 1000 crosslinker, Spectronics Corporation). Une membrane représentant l'ensemble des ADNc (à 1 semaine) a été générée pour chaque gène étudié.



### 2.2.2 Hybridation des membranes

Les sondes radioactives utilisées pour l'hybridation sont décrites à la section 2.1. Chaque membrane a été incubée dans 20 ml d'une solution de préhybridation (600 mM NaCl, 120 mM Tris, 4 mM EDTA, 0.1% Na<sub>4</sub>pyrophosphate, 0.2% SDS et 500 µg/ml d'héparine) à 68°C pendant 4 à 6 hr. Les membranes ont été transférées dans 20 ml d'une solution d'hybridation (600 mM NaCl, 120 mM Tris, 4 mM EDTA, 0.1% Na<sub>4</sub>pyrophosphate, 0.2% SDS, 500 µg/ml heparin et 10% dextran sulfate) et les sondes marquées et dénaturées (100°C, 5 min) ont été ajoutées à la solution d'hybridation. L'hybridation a été effectuée à 68°C pendant 14 à 16 hr. Les membranes ont subies trois lavages à 68°C dans 20 ml de solutions de lavage soit : 20 minutes dans la première (2X SCC, 0.1 % SDS) et 2 fois 45 min dans la deuxième (0.1X SCC, 0.1 % SDS). Les membranes ont été exposées à un écran au phosphore (Storage Phosphor Screen, Amersham Biosciences) pour un minimum de 4 hr. La lecture de l'écran au phosphore a été réalisée à l'aide de l'appareil Storm<sup>TM</sup> 840 Amersham Biosciences.

### 2.2.3 Détermination de la grandeur de l'ADNc complet

À partir du signal d'hybridation obtenu pour l'ADNc à cloner, la distance de migration dans le gel d'agarose a été évaluée à partir du puit. Afin de déterminer le poids moléculaire de l'ADNc, sa distance de migration a été comparée à l'aide d'un graphique qui représentait les poids moléculaires standards en fonction de leur distance de migration respective. La grandeur estimée de l'ADNc pleine longueur a permis d'établir une mini-génothèque à plus ou moins 500 pb de l'ADNc à cloner.

### 2.3 Préparation de la mini-génothèque d'ADNc

Une amplification par PCR suivie d'une extraction au phénol-chloroforme et d'une concentration des ADNc par précipitation et leur séparation sur gel d'agarose TBE a été réalisée tel que décrit à la section 3.1. Une bande d'agarose a été découpée sous les UV pour obtenir les ADNc correspondant au poids moléculaire souhaité et tel que défini à la section 2.2.3. Les ADNc ont alors été purifiés par QIAquick (Gel Extraction Kit,

Qiagen Inc). Les ADNc purifiés ont subi une amplification par PCR de 13 cycles ( activation 95°C : 1 min; cycle : 95°C : 5 sec; 65°C : 5 sec; 68°C : 6 min) avec 2 µl de l'ADNc purifié en utilisant : 5 µl du tampon de PCR 10X Advantage, 1 µl PCR-primer II A (12 µM), 1 µl de dNTP mix (10 mM), 40 µl d'eau stérile et 1 µl d'ADN polymérase Advantage<sup>TM</sup> 2 (BD Biosciences Clontech) pour un volume final de la réaction de 50 µl. Les réactions de PCR ont été effectuées dans l'appareil Mastercycler® ep (Eppendorf) puis, les produits ont été conservés à 4°C.

Les amplicons ont été déposés dans trois puits (10 µl, 20 µl, 20µl) puis ont été séparés sur gel d'agarose de 1% TAE à 115 volts durant 30-45 minutes. Le produit amplifié a été observé sous UV afin de vérifier la qualité et le poids moléculaire des ADNc amplifiés. La bande du puit contenant 10 µl a été transférée sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>; Amersham Biosciences) par transfert capillaire alcalin (Sambrook et Russell, 2001). Par la suite, les ADNc ont, par la suite, été fixés à la membrane par un traitement aux UV (2X150 mJ; SpectroLinker<sup>TM</sup> XL 1000 crosslinker). Cette membrane a servi de contrôle positif lors du criblage de la génothèque d'ADNc. Les deux autres bandes ont été découpées sous les UV et les ADNc ont été extraits et élués dans un volume final de 30 µl (QIAquick, Gel Extraction Kit, Qiagen Inc).

## **2.4 Établissement de la mini-génothèque d'ADNc**

### **2.4.1 Ligation des ADNc amplifiés par PCR**

Les ADNc purifiés à l'étape précédente ont été clonés dans le plasmide pDrive (Qiagen PCR cloning kit) dans une réaction de 10 µl : 4 µl des ADNc purifiés (section 2.3), 1 µl plasmide, 5 µl du mélange de ligase. Le tout a été incubé à 16°C pour un minimum de 16 hr. L'établissement de la mini-génothèque d'ADNc a été adaptée du protocole de Lévesque *et al.* (2003).

#### **2.4.2 Transformation bactérienne**

De 3 à 10 µl de la ligation (section 2.4.1) ont été utilisés pour transformer 50 µl de bactéries compétentes DH5α<sup>TM</sup> (Competent Cells; Invitrogen Corporation) par choc thermique suivant les instructions du manufacturier. Les bactéries ont été incubées à 37°C avec agitation pendant 1 hr dans 1 ml de milieu SOC (Sambrook et Russell, 2001). Le produit de la transformation a alors été étalé sur des boîtes de pétris de 100 mm sur un milieu d'agar S-Gal/LB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) contenant 40 µg/ml de kanamycine à raison de 100 µl par pétri. Les bactéries étalées ont été incubées à 37°C pour un minimum de 16 hr.

#### **2.4.3 Repiquage des colonies bactériennes**

Les colonies blanches contenant des plasmides recombinants ont été individuellement repiquées à l'aide de cure-dents stériles dans des plaques de 96 puits contenant 200 µl par puit de milieu Hoggness (milieu LB supplémenté avec 8.8% de glycérol, 55 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 26 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>) et 40 µl/ml de kanamycin). Le tout a été incubé un minimum de 20 hr à 37°C sans agitation. Au total, 16 plaques ont été repiquées par génothèque d'ADNc.

Les bactéries ont ensuite été transférées à l'aide d'un appareil de réplique de 96 tiges (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) sur des membranes de nylon chargées positivement (Immobilon-NY+, Millipore Corporation, Bedford, MA) préalablement déposées sur un milieu LB agar contenant 40 µg/ml de kanamycine. Quatre plaques de 96 puits ont été transférées par membrane de façon à diminuer à quatre le nombre de membranes à hybrider par génothèque. Les membranes ont été incubées 8 à 10 h à 37°C puis conservées à 4°C. Les plaques de bactéries de 96 puits ont été congelées à -80°C.

#### **2.4.4 Traitement des membranes**

Les membranes contenant les colonies bactériennes repiquées à la section 2.4.3 ont été retirées des plaques et marquées à l'aide d'un stylo à bille vis-à-vis 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 colonies bactériennes sur les membranes ont ensuite été dénaturées par le passage dans différentes solutions soit : une solution dénaturante alcaline (0.5M NaOH, 1.5M NaCl; 10 min), suivi de deux passages dans une solution neutralisante (0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl; 3 min) et dans du SSC 2X (3 M NaCl, 0.3M sodium citrate; 2 min). Par la suite l'ADN plasmidique relâché des bactéries a été fixé aux membranes par un traitement aux UV (2X150 mJ; SpectroLinker™ XL 1000 crosslinker). Les membranes ont été conservées à la température de la pièce jusqu'à l'hybridation.

## **2.5 Criblage de la mini-génothèque d'ADNc**

### **2.5.1 Hybridation des membranes**

L'hybridation des membranes de la mini-génothèque d'ADNc a suivi le même protocole que l'hybridation décrite à la section 2.2.2 à l'exception du dextran sulfate qui a été omis et des températures de préhybridation, d'hybridation et de lavage qui étaient de 65°C. De plus, le contrôle positif décrit à la section 2.3 a été hybridé en même temps que les membranes contenant la génothèque d'ADNc.

### **2.5.2 Choix des clones positifs**

Le contour et les marques au stylo des membranes de nylon ont été reproduits sur un transparent afin de permettre l'alignement aux résultats d'hybridation. De cette façon, il fut possible de déterminer précisément les clones positifs, c'est-à-dire les plasmides ayant incorporé l'ADNc recherché. Les clones positifs ont ensuite été repiqués directement des plaques congelées de 96 puits, dans des tubes de culture contenant le milieu LB avec kanamycine puis incubés avec agitation pour un minimum de 16 h (Zoë, sois consistante... soit tu écris heure ou h) à 37°C. L'ADN plasmidique a été purifié à l'aide d'une trousse commerciale (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). La concentration d'ADN a été estimée par densité optique à 260 nm. Une digestion par

*EcoR*I a été réalisée pour vérifier la grandeur de l'insert d'ADNc. Les clones positifs ont été séquencés avec l'amorce PCR-Nested 1 (1.5 mM) selon la méthode didéoxy à l'aide de la trousse «Big Dye Terminator 3.1» (ABI Prism, Applied BioSystem, PE, Branchburg, NJ). Les produits de séquençage ont été séparés avec l'appareil ABI Prism 310 (Applied Biosystem). Les séquences d'acides nucléiques ont été comparées à l'aide de la fonction BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) dans les banques de données de GenBank.

### **3. Expression temporelle du gène**

#### **3.1 Extraction de l'ARN total**

L'extraction de l'ARN total des divers échantillons de peau et de plaie a été réalisée selon la technique de Chomczynski et Sacchi (1987), qui a été adaptée au laboratoire (Bedard *et al.*, 2003). La moitié de chacune des biopsies congelées a été utilisée. Les tissus furent coupés en petits morceaux (1 mm) à l'aide d'une lame de rasoir pour faciliter leur homogénéisation dans 2.5 ml de solution dénaturante (4 M guanidium isothiocyanate, 0.5% Na-N-laurylsarcosine, 25 mM Na-citrate, pH 7) à l'aide d'un polytron à une vitesse moyenne de 8000 rpm. L'homogénat a ensuite été transféré sur un coussin de chlorure de césium (5.9 M ClCs, 0.1 M EDTA) puis centrifugé durant 4 hr à 267 000 G à une température de 20 °C. Le culot d'ARN a été resuspendu dans la solution dénaturante suivit d'une extraction au phénol-chloroforme et précipité à l'isopropanol (Chomczynski et Sacchi, 1987). La concentration d'ARN total a été estimée par densité optique à 260 nm. La qualité de l'ARN a été vérifiée d'une part par le ratio des densités optiques à 260 nm / 280 nm et d'autre part par la visualisation des bandes ribosomales 28S et 18S suite à la séparation de 1 µg d'échantillon sur un gel d'agarose 1 % en conditions dénaturantes (0.74 M formaldéhyde, 40 mM MOPS, 0.01 mM Na-acétate, 0.2 mM EDTA, pH 7). L'ARN ribosomal de 28S et 18S a été visualisé suite à un transfert par capillarité dans le 10X SSC (1.5 M NaCl, 150 mM Na-citrate) sur une membrane de nylon non-chargée (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) suivit d'une coloration de l'ARN au bleu de méthylène (Sambrook et Russell, 2001).

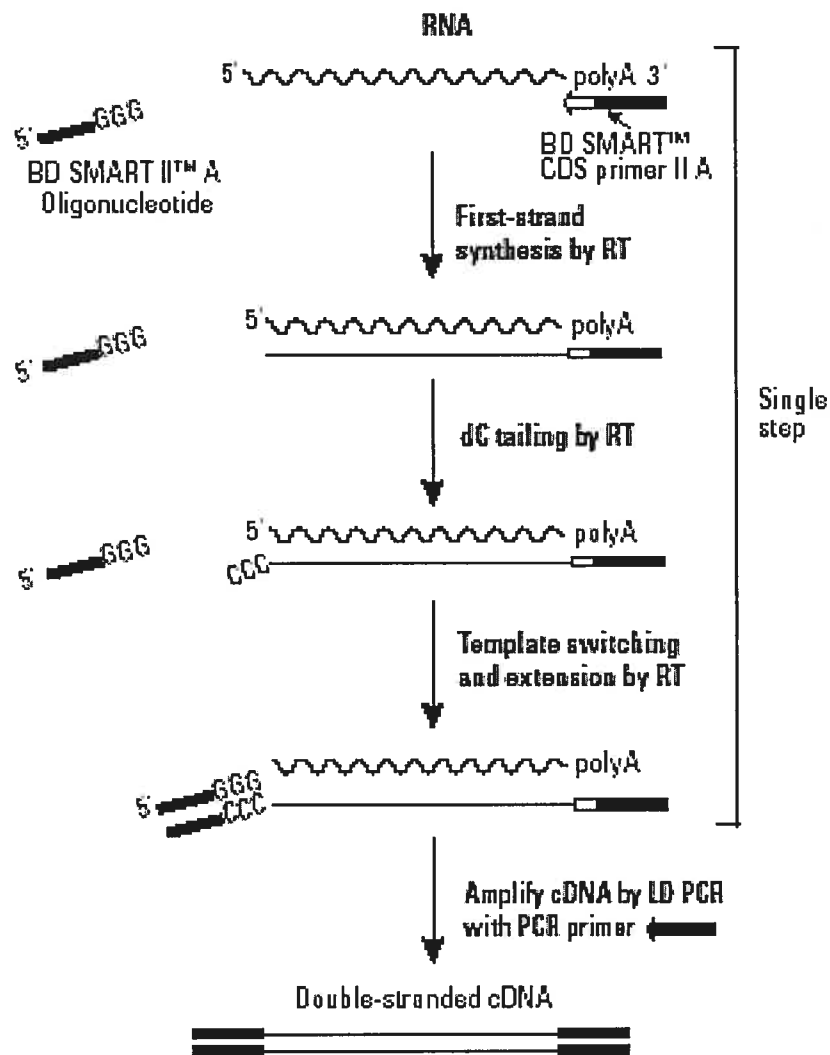
### 3.2 Analyse de l'expression de l'ARNm par RT-PCR semi-quantitatif

Les ARN totaux ont été transformés en ADNc. Pour ce faire, trois pools différents d'ARN totaux ont été formés en regroupant 1 µg d'ARN total d'échantillons de guérison normale du thorax (n = 4 juments); de guérison normale d'un membre (n = 4 juments) et de guérison avec bouton de chair à un membre (n = 4 juments), à chacune des semaines de guérison. De chacun de ces pools, 1 µg 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)(voir figure 4). 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. La trousse utilise la technique de transcription inversée et requiert une amplification par PCR de l'ensemble des ADNc.

La technique de SMART se divise en deux étapes, la première étant la synthèse du simple brin d'ADNc à partir de l'ARN total (selon les recommandations du manufacturier (user manual : PT3041-1) à l'exception de l'ajout de 42 ng de la protéine du gène 32 du phage T4 (« T4 Gene 32 Protein »; Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). Les ADNc simple brin ont été synthétisés à l'aide d'un oligo-dT<sub>30</sub> (CDS: tableau II) spécialement formulé (réaction de 1 hr à 42°C). La particularité de cette transcriptase inverse est sa capacité à ajouter des résidus guanosines lorsqu'elle atteint l'extrémité 5'-UTR de l'ARNm. La seconde étape permet l'amplification par PCR des ADNc simple brin. Un µl d'ADNc simple brin a été utilisé, ainsi que la polymérase Advantage 2 polymerase (Clontech Lab Inc). Deux oligos ont été utilisés, un oligo sens qui s'ancrait aux guanosines en 5'-UTR (SMART II) et un oligo anti-sens qui s'ancrait à la queue polyA<sup>+</sup> (CDS: tableau III). Le nombre de cycles nécessaire pour la réaction de PCR de 100 µl du Smart est déterminé en s'assurant que le gène contrôle GAPDH soit de même intensité pour tous les pools, soit entre 18 et 23 cycles. Les conditions de PCR étaient les suivantes : activation à 95 °C, 1 min suivit d'un nombre variable de cycles à : 95 °C 7sec, 65°C 15sec, 68°C 6min.

**Tableau III. Liste des oligonucléotides utilisés et qui sont fournis dans la trousse « SMART PCR cDNA Synthesis » de Clontech.**

Noms	Séquence (5' vers 3')
SMART II	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG
CDS	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT (30) (A/C/G/T) (A/G/C)



**Figure 4. Étapes de la transformation des ARNm en ADNc double brins à l'aide de la trousse « SMART PCR cDNA synthesis ».**

Par la suite les produits de PCR ont été dilués 10 fois dans le tampon TE en prévision des PCR avec les oligos pour les gènes spécifiques. Les PCR spécifiques se font tous dans un volume final de 25  $\mu$ l comprenant: 18.5  $\mu$ l d'eau, 2.5  $\mu$ l 10 X tampon PCR, 1  $\mu$ l primer sens (10 $\mu$ M), 1  $\mu$ l de primer anti-sens (10 $\mu$ M), 0.5  $\mu$ l de dNTP mix (10 $\mu$ M) et 0.5  $\mu$ l de polymérase Advantage 2, selon les paramètres suivants, soit : 95°C 30 sec, 64°C 45 sec et 68°C 90 sec selon un nombre de cycles de PCR optimisé pour chaque gène. Les amorces pour les différents gènes sont présentées au tableau III. Le nombre de cycles de PCR effectués pour les différents gènes ont été les suivants: GAPDH = 18 cycles ; PECAM1 = 22 cycles ; PI10 = 22 cycles et PEDF = 21 cycles. Les produits de PCR obtenus ont été entièrement transférés sur un gel d'agarose 2 % avec bromure d'éthidium et visualisés à l'aide d'UV. Des photos digitales ont été captées 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/>).

**Tableau IV. Liste des oligonucléotides formulés pour l'expression temporelle.**

Noms	Séquences (5' vers 3')
eGAPD-A	CAAGTTCCATGGCACAGTCACGG
eGAPD-1	AAAGTGGTCGTTGAGGGCAATGC
ePECAM1-E	TTACTCGCCTGCGACTCATGC
ePECAM1-5	GGGACATATACCTGCACCGCA
eSB10-G	ATTGCCAATCCTGTTCCGGTGG
eSB10-3	TTCTGGCAGTAGTATGAGCAGG
eSF1-B	GATTAACAACCTGGGTGCAGGCC
eSF1-3	CTCTAGGGT TTTCTTCATCTAGGG



#### 4. Analyse statistique

Le RT-PCR a été réalisé en triplicata pour chacun des gènes, puis les valeurs obtenues ont été normalisées contre celles du GAPDH correspondant. Le modèle linéaire à mesures répétées, avec le temps et le groupe comme facteurs intra-sujets a été utilisé pour établir l'effet du temps et du groupe sur les résultats. Il est à noter que les mesures répétées représentent les répliquats des RT-PCR ce qui donne une variabilité inter-mesures et non inter-sujets. Puis, quand le modèle linéaire à mesures répétées indiquait des différences significatives ( $P < 0.05$ ) des contrastes à priori étaient utilisés pour comparer les moyennes individuelles pré-sélectionnées. Toutes les analyses ont été effectuées avec une valeur de  $P < 0.05$ , en utilisant le programme SAS v. 9.1. (Cary, N.C.).

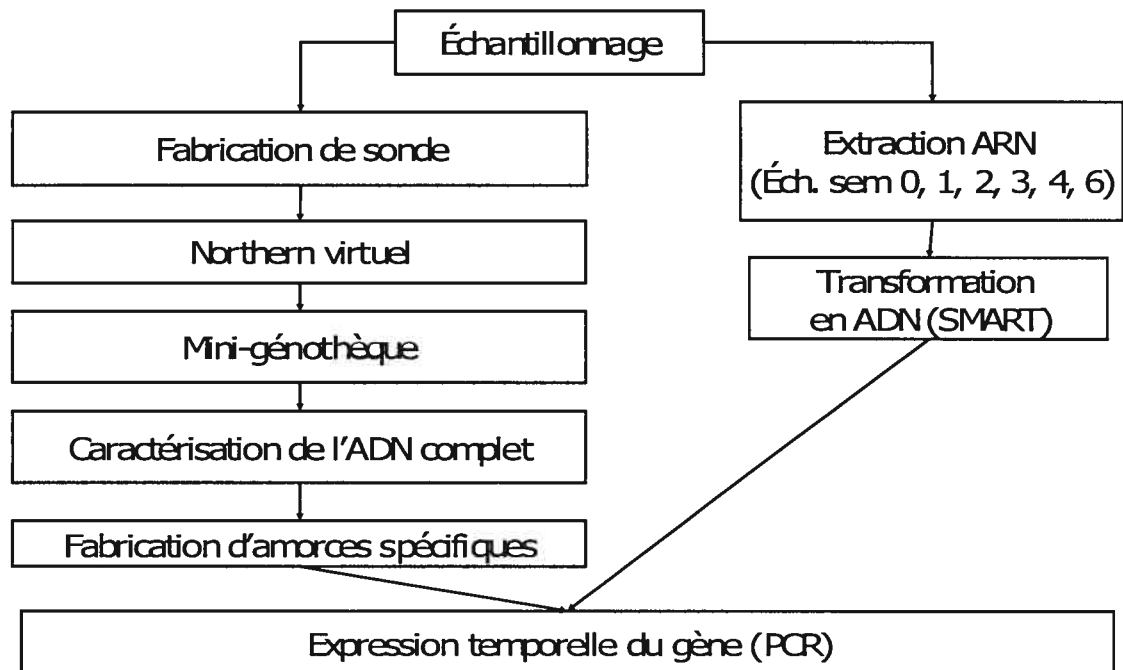


Figure 5. Schéma résumant la méthodologie.

## Résultats

### **1. Clonage et caractérisation de l'ADNc équin pour PECAM1, PI10 et PEDF**

Les fragments d'ADNc équin utilisés pour le Northern virtuel provenaient des séquences obtenues préalablement lors d'une étude de criblage par HSS visant à déterminer les gènes sur-exprimés durant la guérison tissulaire chez le cheval (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005). Le Northern virtuel a permis de déterminer le poids moléculaire approximatif de l'ADNc pleine longueur des trois différents gènes ciblés dans cette étude, soit entre 3150 et 3750 pb pour PECAM1 et entre 1350 et 1500 pb pour PEDF. PI10 présentait deux bandes soit une entre 1950 et 2300 pb et une entre 1600 et 2000 pb. Les mini-génothèques ont ainsi été construites selon ces poids moléculaires. Chaque mini-génothèque contenait 1568 colonies. L'hybridation des mini-génothèques a permis de déterminer les clones contenant les ADNc recherchés. Pour PECAM1, onze colonies des 1568 étaient positives, quatre ont été choisies pour être purifiées et analysées par digestion, puis, de ces quatre clones d'ADNc, trois ont été caractérisés par séquençage. La comparaison des séquences par le logiciel BLAST dans les bases de données GenBank nous a permis de déterminer que deux de ces trois colonies contenaient effectivement l'ADNc de PECAM1. Pour PI10, une colonie des 1568 était positive et donc fut purifiée, digérée ainsi que séquençée pour la mini-génothèque située entre 1950 et 2300 pb. La comparaison des séquences par analyse BLAST dans les bases de données GenBank a permis d'identifier l'ADNc de PI10. Cependant aucune colonie n'a été positive pour la mini-génothèque située entre 1600 et 2000 pb. Pour PEDF, deux colonies des 1568 étaient positives et leur contenu a été caractérisé. Les séquences obtenues ont été analysées par BLAST dans les banques de données GenBank. GenBank a révélé qu'une de ces deux colonies contenait l'ADNc de PEDF. Le séquençage complet subséquent a permis de déterminer la séquence en acides nucléiques de chaque ADNc et la traduction en acides aminés a été déduite à l'aide du programme GeneDoc (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility Version 2.6002).

Les résultats démontrent que l'ADNc complet de PECAM1 équin contient 3381 pb (DQ310372) dont 156 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 2217 pb codant pour une protéine de 738 acides aminés et une portion 3' non-codante de 1008 pb contenant un signal de polyadénylation suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (figure 6). Les valeurs les plus fiables montrent une identité élevée de la séquence nucléique équine avec celles de l'aurochs (85%; D82082), de *Canis familiaris* (84%; XM\_848326) et de *Sus scrofa* (83%; NM\_213907).

L'ADNc de PI10 équin complet correspond quant à lui à 2229 pb (DQ310373) dont 60 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 1032 pb codant pour une protéine de 343 acides aminés et une portion 3' non-codante de 1139 pb qui renferme trois signaux de polyadénylation suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (figure 7). Les valeurs les plus fiables montrent une identité élevée de la séquence nucléique équine avec celles de *Bos taurus* (88%; XM\_864651), de *Canis familiaris* (87%; XM\_541071) et de *Homo sapiens* (86%; BC096219).

Finalement, l'ADNc de PEDF équin complet correspond à 1464 pb (DQ310374) dont 84 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 1254 pb codant pour une protéine de 417 acides aminés avec un poids moléculaire (théorique) de 46.14 kDa et un point isoélectrique de 6.3, ainsi qu'une portion 3' non-codante de 126 pb renfermant un signal de polyadénylation suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (figure 8). Les valeurs les plus fiables montrent une identité élevée de la séquence nucléique équine avec celles de *Bos taurus* (88%; BC112656), de *Sus scrofa* (88%; DQ789896), de *Homo sapiens* (87%; NM\_002615), de *Canis familiaris* (87%; XM\_848921) et de *Mus musculus* (84%; AF017057). Un signal peptide de M<sup>1</sup> à C<sup>19</sup> dans la portion N-terminale a été identifié et devrait être clivé laissant une protéine mature sécrétée d'une masse théorique de 44.2 kDa avec un point isoélectrique de 6.2. La protéine équine de PEDF contient le domaine des serpinines (L<sup>47</sup>-P<sup>414</sup>) ainsi qu'un site potentiel de glycosylation (N<sup>285</sup>).

**Tableau V. Identité des séquences d'ADNc équines avec les séquences d'autres espèces.** L'identité représente le pourcentage d'identité estimée de la séquence de nucléotides équines avec les séquences de nucléotides dans GenBank via une recherche Blastn.

Identification de la séquence	Espèce	Numéro D'accession	Identité	Valeur attendue*
PECAM1	<i>Aurochs</i>	D82082	85%	0.0
PECAM1	<i>Bos taurus</i>	NM_174571	84%	$5 e^{-147}$
PECAM1	<i>Canis familiaris</i>	XM_848326	84%	0.0
PECAM1	<i>Sus scrofa</i>	NM_213907	83%	0.0
PECAM1	<i>Homo sapiens</i>	AF281301	81%	$1 e^{-163}$
PI10	<i>Bos taurus</i>	XM_864651	88%	0.0
PI10	<i>Canis familiaris</i>	XM_541071	87%	0.0
PI10	<i>Homo sapiens</i>	BC096219	86%	0.0
PI10	<i>Mus musculus</i>	NM_198028	80%	$3 e^{-101}$
PI10	<i>Rattus norvegicus</i>	BC061735	80%	$4 e^{-54}$
PEDF	<i>Bos Taurus</i>	BC112656	88%	0.0
PEDF	<i>Sus scrofa</i>	DQ789896	88%	0.0
PEDF	<i>Homo sapiens</i>	NM_002615	87%	0.0
PEDF	<i>Canis familiaris</i>	XM_848921	87%	0.0
PEDF	<i>Mus musculus</i>	AF017057	84%	0.0

\*La valeur attendue est un paramètre qui décrit le nombre de résultats auxquels on peut s'attendre par chance lorsque l'on cherche dans une banque de données d'une certaine taille.

## **2. Analyse de l'expression temporelle de l'ARNm par RT-PCR semi-quantitatif pour PECAM1, PI10 et PEDF dans les plaies thoraciques, dans les plaies aux membres guérissant normalement ou dans les plaies aux membres développant du tissu de granulation excessif.**

Le nombre de cycles nécessaires pour la réaction de PCR de 100 µl du Smart a été déterminé en s'assurant que le gène contrôle GAPDH soit de même intensité pour tous les pools, soit entre 18 et 23 cycles. Les RT-PCR ont été effectués en triplicat pour chaque gène, puis normalisés avec GAPDH (figure 12).

L'analyse de l'expression temporelle de PECAM1 indique un effet non-significatif du groupe tous temps confondus ( $p = 0.93$ ). Cependant, on remarque qu'au temps zéro l'expression de PECAM1 est significativement plus élevée dans les membres. L'effet du groupe variait d'un temps à l'autre ( $p < 0.0001$ ). Les résultats montrent aussi un effet significatif du temps tous groupes confondus ( $p < 0.0001$ ), donnant un patron d'expression simplifié comme montré à la figure 13 pour chaque groupe. Pour ce qui est de l'expression temporelle de PI10 les résultats indiquent un effet significatif du groupe tous temps confondus ( $p = 0.04$ ) et du temps tous groupes confondus ( $p < 0.0001$ ). L'effet du groupe variait d'un temps à l'autre ( $p < 0.0001$ ). Sur toute la période, l'aire (PI10/GAPDH, unité relative) était moins élevée dans le groupe thorax que dans les deux autres groupes, donnant un patron d'expression simplifié comme montré à la figure 13. Finalement l'expression temporelle de PEDF indique un effet non-significatif du groupe tous temps confondus ( $p = 0.16$ ) mais montre un effet significatif du temps tous groupes confondus ( $p = 0.005$ ). L'effet du groupe variait d'un temps à l'autre ( $p = 0.005$ ), donnant un patron d'expression simplifié comme montré à la figure 13.

**Figure 6. Séquence en acides nucléiques et aminés de PECAM1 équin.** L'ADNc de PECAM1 équin correspond à 3381 pb dont 156 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 2217 pb codant pour une protéine de 738 acides aminés. La portion 3' non-codante de 1008 pb renferme un signal de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (non-représentée). 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

## PECAM1

-156 ACAGCCAGTCTCTCTGCAGCGCCTGGAGAAGTTACC  
 -120 AGAGTGGTCTCTCTGCTTTTTCACAGCGCGGGTTTCTCATCTGTGGCACGTGGAAAGCATC  
 -60 TTCTGCCCCAGGGGCATGGCCCCGAATGCAGAACTAACTGTGTGAAGACGTCTCTCTCAGG  
 1 ATGCATCAGGGGTGGGCCCCGAGAGGGCAAGATGTGGCTCAGAGTCCTGCTGACACTTCTG  
 1 M H Q G W A R E G K M W L R V L L T L L  
 61 CTCTGTTCAAGCCTTGAGGGTCAAGAAAACCTTTTACCATCAACAGCATCTACATGAAG  
 21 L C S S L E G Q E N S F T I N S I Y M K  
 121 ATCCTGCCAAGGGACACGGTGCAAAATGGGGAGAACCTGACCCTGCAGTGCATCGTGGAT  
 41 I L P R D T V Q N G E N L T L Q C I V D  
 181 **GTCAGCACC**ACCTCACGAGTCAAGCCTAAGCACTCGCTGCTGTTCTATAAGGATGATGTG  
 61 V S T T S R V K P K H S L L F Y K D D V  
 241 CTGTTTTACAACGTCTCCTCCATCGAGAACACAGAGAGTTATGTTATTTCCCAAGCCCGA  
 81 L F Y N V S S I E N T E S Y V I P Q A R  
 301 GTCTATGACGCAGGGATCTACAAATGCAGTGTGATTCTAAACAACAAGCAGAAAACCACT  
 101 V Y D A G I Y K C S V I L N N K Q K T T  
 361 GCAGAGTCCCAAGTGTGGTAAAAGGAGTGCCCCGTCCAGAGTGACGCTGGCAAGAAG  
 121 A E S Q V L V K G V P R P R V T L D K K  
 421 **GAGACCATAGAAGGCG**GGACCGTGACGGTCAACTGTTCTGTCCCAGAGGAAAGGGCCCCA  
 141 E T I E G G T V T V N C S V P E E R A P  
 481 ATACATTTACCATTGAAAAACACGACCTAGACACAAAAGGTTTCCGGCAAAAAGAGAA  
 161 I H F T I E K H D L D T K G F R Q K R E  
 541 AAAACTTACAGAAGCAGAATTTGTGACGCTGGAATTTACAGTTGAGGAACAGGACCGT  
 181 K T S Q K Q N F V T L E F T V E E Q D R  
 601 CTTTTATCATTCCATTGTCAAGCTAGCATCGTTTCTGGGAACCGTGTGGAGACCTCTGAA  
 201 L L S F H C Q A S I V S G N R V E T S E  
 661 TCCAGCAGGAGTGAAGTGGTCAAGTGCAGAAATCCTTCTCT**ATGCCCAAATTCAACGTG**  
 221 S S R S E L V T V T E S F S M P K F N V  
 721 **AGCCCCAGGGAAAGAT**CGCAGAAGGAGAACAGCTCCGCATTGTGTGCACCATTCAAGTG  
 241 S P Q G K I A E G E Q L R I V C T I Q V  
 781 AGGCACTTGGCCAGTTTCCAGAAATCATAATCCAGAAGGACAAGGTGATTGTGGCACAC  
 261 R H L A Q F P E I I I Q K D K V I V A H  
 841 AGTAATCATGGCAGTGAG**GCTGTCTACTCAGTGATGGCCAT**GATGGAACACAACGGCAAC  
 281 S N H G S E A V Y S V M A M M E H N G N  
 901 TACACATGCAAAGTGGAAAGCCAGTCGGATATCCAAGGTCAACCAGCATCATGGTCAACATC  
 301 Y T C K V E A S R I S K V T S I M V N I  
 961 ACAGAGCTATTTTCCAAGCCGAAGCTGGAATCTCCACCATACGTCTGGACAAGGGTGGGA  
 321 T E L F S K P K L E S P T I R L D K G G  
 1021 AGCTTGGACTTGTGGTGTCCATTCCAGGAGCGCCTACAGCCAACCTCACCATCCAGAAG  
 341 S L D L W C S I P G A P T A N F T I Q K  
 1081 GGACACACGGTTGTGTCTCAGTCTCAAATTTTACCAAGATAGCCTCAAAGTGGGGCAGC  
 361 G H T V V S Q S Q I F T K I A S K W G S  
 1141 **GGACATATACCTGCACCGC**AGGCATCGGCAAGGTGGTCAAGAAAAGCAA**CACGGTCCAG**  
 381 G T Y T C T A G I G K V V K K S N T V Q  
 1201 **ATAGCCGTGTGT**GAAATGCTCTCCAAGCCCAAGATTTTTTCGTGACTCCAAATCTGAGGTG  
 401 I A V C E M L S K P K I F R D S K S E V  
 1261 ATAAAAGGACAGGCCATAGAAGTCAGTTGCCAATCCAGTGACGGAACCTCGCCTATTTTT  
 421 I K G Q A I E V S C Q S S D G T S P I F  
 1321 TATCAACTTTTTAAAGCAAATAATGTTTTGAAGAGTCATAACATGAGCTCAAATGAGCCT  
 441 Y Q L F K A N N V L K S H N M S S N E P  
 1381 GCGGTATTCAAAGATAACCCAACAAAGGACGTTGAATACTACTGTATCGTGGATAATTGC  
 461 A V F K D N P T K D V E Y Y C I V D N C

Figure 6

**1441** CATTCCACACCAAAATGGTCAGTGAAGTTCTGCGGGTCAAGGTGATAGCCCCGGTGGAG  
 481 H S H T K M V S E V L R V K V I A P V E  
**1501** GAGGTTAAGCTCTCTATCCTGTTGACTGAGGTGGTGGAGACGGGGAAGCCCATTGTGCTT  
 501 E V K L S I L L T E V V E T G K P I V L  
**1561** CGATGCTCCGTGAACAATGCGTCTGGTCCAATCACCTACACGTTTTACAGAGAAAAGGAG  
 521 R C S V N N A S G P I T Y T F Y R E K E  
**1621** GGCAAGCCCTTCTACCAAGTCATATCGAATGAGACCCAAGCCATTTGGCATGAGTCGCAG  
 541 G K P F Y Q V I S N E T Q A I W H E S Q  
**1681** GCGAGTAAGGAGCAGGAGGGACAGTATTATTGCACAGCCTCCAACAGAGCCAACCTTGCC  
 561 A S K E Q E G Q Y Y C T A S N R A N L A  
**1741** AAAAAGGTCCCCAAAGCAACGCGCTCACAGTTAGAGTCTTTCTTTCCCGTGGAAAGAAA  
 581 K K V P Q S N A L T V R V F L S P W K K  
**1801** GGACTTATTGCAGTGGTCATCATTGGAGTGATAATTGCTCTCTTGATACTCGGGGCCAGA  
 601 G L I A V V I I G V I I A L L I L G A R  
**1861** TGCTATTTTCTGAAGAAAGCCAAAGCCAAGCAGAATCCAGTGGCGATGCCAGGCTGGGA  
 621 C Y F L K K A K A K Q N P V A M P R L G  
**1921** GCACCATTCTGAACTCCAACAACGAGAAGATGTTGTGAGATCCCAATACTGAGGCCAAC  
 641 A P L L N S N N E K M L S D P N T E A N  
**1981** AGACATTATGGTTATAGTGAAGATGTTGGAAACCATGCGATGAAACCAATCAATGAAAAC  
 661 R H Y G Y S E D V G N H A M K P I N E N  
**2041** AAAGAGCCTCTGACCTCGGACGTGGAGTACACGGAAGTGGAAGTGACCTACCTGAACCT  
 681 K E P L T S D V E Y T E V E V T S P E P  
**2101** CATCAAGGTCTGGGAACAAAGGGCACGGAGACGGTGTACAGTGAAATCCGGAAAGCTGAT  
 701 H Q G L G T K G T E T V Y S E I R K A D  
**2161** CCTGATTTCTGTTGAAAACAGATATTCTAGAACGGAAGGCTCCCTTGATGGAAGTGGAC  
 721 P D F V E N R Y S R T E G S L D G T \*  
**2201** TACAAGAGCAGATGCTCCTCCCTGGGAAGACATCCACATTCCAAGAAGAGCAGATGATTC  
**2261** CTGTGTTCCAAGAGCTCTGTGCACTTATTTATGAACCTGCCCTGCTCCCACTGAACAAAG  
**2321** CAATTCCTCAGACCAAGTACCAGTTTCTAAATCCATCTTACTACAGTTATGCTGGATAT  
**2381** AAAGAGATGCATAGGGGCTGGTTAATTTCCAACACGGCCACCTCTACCAAGTTGGAGC  
**2441** ATCCTCAGGAGTGAAGAGCAGCAGAAGGAGGTTTCAGAGTAAACAGGCCATTGGGATATTT  
**2501** CGAAACTTGAATATTTTGTCTTGTACAGAGATAAAGAACTTTTCCAAGCACCTCATAACA  
**2561** CAGAAACCTGTTTTTGTGTTTGTAGTCAATCACTTCTAGGCGAATGGCCTGGCTTAGAGGC  
**2621** TAGTTTTTCTCTTTGCCTTTGGTCCTTCAAAGGCCTGTGGTTCTGGGTAGTCTTTGTTTC  
**2681** TGGAAGTGACAGCACTGACCAGACGGCTGCACCCTGTCCCCTCTACGACCTCACCCGCC  
**2741** ACAAATGGAAAAACAAAGCTGCTTGAGAGTGACCCCTTTAGATGCCGACTTGAAGACAAG  
**2801** GTTCATTCCGGGCAATGCACAAAATAGAAAATGAAGTTGGACAAAGCACAGATGTTCTTA  
**2861** AGCTGTTTTTCTATAACCTCTCTTTCTTTTCTCTACCTTACTGAAGGCTGAAGACAGG  
**2921** AATATGGTGGCTACAGCAAATATTGTTTTAATAGAAAAATGAAATGCCTATTTTTCTTA  
**2981** CTAATTTTTTTTTATTTATTCTTTGCTAAAGAAATGGTCTCCTGAGGTCTTAAGATGTTT  
**3041** CTGATCGTGTCTTGAGTAGGTGGACGAGGGGCTGTGGCCATTTTGTGGTGAATTTCACT  
**3101** AGTGAGCACAGCTAAGCGAAACCACTTCCCCTGTCCACCTCAGAGACAGGCTGCAGGGA  
**3161** CCCTGTGGGGTGTGTATTAATAAAATTTGATCTTTACTCTTCAT

Figure 6



**Figure 7. Séquence en acides nucléiques et aminés de PI10 équin.** L'ADNc de PI10 équin correspond à 2229 pb dont 60 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 1032 pb codant pour une protéine de 343 acides aminés. La portion 3' non-codante de 1139 pb renferme trois signaux de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (non représentée). 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.

## PI10

-60 ATCTTACTGAAGAAGCAAATTGCCAATCCTGTTCCGGTGAAGAAAACAAGGTTTTCCCA  
 1 ATGGATTCTTTAGCAAATCAATCAACCAATTTGCCTTCGAATTTAGCAAGAAGCTAGCT  
 1 M D S L A K S I N Q F A F E F S K K L A  
 61 GAATCTGCTGAGGGTAAAAATATTTTTCTTTCTCCCTGGGGCATCTCAACCTCATTGGCC  
 21 E S A E G K N I F F S P W G I S T S L A  
 121 ATGGTGTACTTGGGCGCCAAAGGGACCACTGCAGCCCAAATGGCCCAGGTGCTTCAGTTT  
 41 M V Y L G A K G T T A A Q M A Q V L Q F  
 181 AACAGAGACCAGGACATCAAAAGTTTTTCATGAAAGTGAAAAGAAAATGAAAATGGAATTC  
 61 N R D Q D I K S F H E S E K K M K M E F  
 241 AACTTGGTAAAGGTTGAAGAAATCCACTCTAATTTCCAGACACTTATCTCAGAAATCAAC  
 81 N L V K V E E I H S N F Q T L I S E I N  
 301 AATTGCAACAATGCCTACATACTTAAACAGCCAACAGGGTCTATGCGGAGAAAACATCAT  
 101 N C N N A Y I L K T A N R V Y A E K T H  
 361 CCATTTCTCATTAAATATTTAGAAAGACATGAAAACATACTTTGGTGCAGAGCCACAGTCT  
 121 P F L I K Y L E D M K T Y F G A E P Q S  
 421 GTTAACTTTTTGGAAGCTTCTGGACGAGTCAGAAAGGAGATCAACTCTTGGGTGCAAAGC  
 141 V N F L E A S G R V R K E I N S W V E S  
 481 CAGACTGAGGGAAAAATCCTGAATCTCCTACCTGATGACTCTGTGGCTCCTACAACAAA  
 161 Q T E G K I L N L L P D D S V A P T T K  
 541 ATGGTTCTAGTGAACGCCCTTTACTTTAAAGGAATCAGGGAACAGCAATTCTTAGTCCAA  
 181 M V L V N A L Y F K G I R E Q Q F L V Q  
 601 GACACCACAGAAAAGCCTTTTCAGAATAAACAAGACTACAAGCAAACAGTGCAAATGATG  
 201 D T T E K P F R I N K T T S K P V Q M M  
 661 TCAATGAAACAAAACCTTCAAGTTTTTACGTAAGAAAACCCACAAGTCATAGGCCTTCAA  
 221 S M K Q K L Q V F H V E N P Q V I G L Q  
 721 CTCTATTATGAGAACC GCGACCTCAGCCTGCTCATACTACTGCCAGAAGATGTTGGCGGG  
 241 L Y Y E N R D L S L L I L L P E D V G G  
 781 CTGGCTCAGCTGGAAAAGCCATCACCCTATGAGAAGCTGAGTGAGTGACCAGTGCAGAC  
 261 L A Q L E K A I T Y E K L S E W T S A D  
 841 ATGATGGAGTTGTATGACGTGCAGCTGCATCTTCCCAAGTTCAAACCTGGAAGAGTCTTAT  
 281 M M E L Y D V Q L H L P K F K L E E S Y  
 901 GATCTCAAGTCAACCCTGAGCAACATGGGGATGAGTGATGCTTTAACCCGAGCAAAGCTG  
 301 D L K S T L S N M G M S D A L T R A K L  
 961 ATTTCTCAGGAATGTCTATGGACAGAAACCTATTTCTGTCCAAGGTTTTCCACAAGTCTT  
 321 I S Q E C L W T E T Y F C P R F S T S L  
 1021 TTGTGGAATAAATGAACAGGGTACAGAGGCTGCAGCTGGCACTGCGAGTGAGATGGTTT  
 341 L W K \*  
 1081 TGCGAATTAGACTCCCCTCCATTGAATTCAATGCAGACCACCCATTCCTTTTCTTCATCA  
 1141 GGCACAACAAAACCAATAGCATTCTTTTTATGGGAGATTCTGCTCCCCATAAACCCCTAC  
 1201 ATCTCTCTCCTCAAACAAGAGCATCTTACAGTGTGAAAAATACACCATAACGTGGAAAAA  
 1261 CACAGTTATAATAAAAATCAATTTGTAGCCTGGATATTTTTTACATACGAATATTAGCAA  
 1321 AAATATTTTGAATAATGCATTCTAGTGATCCTATCATATCTGTATAGCTAGTGAGAATG  
 1381 GCAAATTTTATTCTTACCCTTAACATTTTATCTTAATGTGACTTTTATCTATATTTTCA  
 1441 AAATCTTTTATTCAATTGAATGCCTTACAATTTCTCAACTATCTTGTCACTGCATTTTCA  
 1501 TTGTCACTTATATTTACATGCATCATTTAATGAAGAAAAATCTTTATAAAGGCAATATA  
 1561 TTGATAACAAGAATTTTCTCAAGAATATTATTTTATGATGGCTCAAAAATTGCCACTGTAA  
 1621 AATTAACCTCCCCTTTTCTGCTGACTATTCAAAAATACTTATGTTGACCTTAATGGAAAA  
 1681 ACTAGTGAAATCCAAATGAAATCTGTAGCTTAGTTAATAGCAATGAACGAATGTTGGCAT  
 1741 CATGGTTTTTAAAAAATGTACCATAGGAATGTTAGATGTCAGTATTAGGGGAAACTGTGTT  
 1801 AAGAGTATGTGAGAATCCCTGTATTAGCTTTGCTGCTTTTCTGTGAATCTAAAAATTATT  
 1861 CCAAATAAAAACCTTTGTTAAAAATAATTATCATGTGTAAAAAGTTGTCATACTAACATCC  
 1921 TTGATTTTTAAAAATCTTATAAATAAGAGTAAATCTGATTTATATAAATATGTATTGT

Figure 7

1981 TAGTTATAAGAAGATATTCTTAGAAATACTGTATTTCCATAAAATTAGCTGTGTCTTTTT  
2041 AATTTCTTTTACAAATGCTAATAGACAAC TACTTATCTGTAGCCTCATCAGCTGTTATTC  
2101 TAATTCAGAGATTAAC TGTATCATTCAAAGATGCCTTTTCTATATTCATCAATAAAGTG  
2161 AAAGCCCT

**Figure 7**

**Figure 8. Séquence en acides nucléiques et aminés de PEDF équin.** L'ADNc de PEDF équin correspond à 1464 pb dont 84 pb en 5' non-codant, un cadre de lecture ouvert de 1254 pb codant pour une protéine de 417 acides aminés. La portion 3' non-codante de 126 pb renferme un signal de polyadénylation (AATAAA; souligné) suivi de la queue poly-A<sup>+</sup> (non représentée). 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.

## PEDF

-84 TAAAAAGTTTTGTGCTTGCTGGAG  
 -60 CCCCC**TCAGTGTGCAGACCTAGGCTGG**GGCGGGAGCTGCAGCACACCCACAGGCCCGGG  
 1 **ATGCAGGCCCTAATGCTACTCCTCTGGACTGGAGCCCTCCTTGGGCATGGCAGCTGCCAG**  
 M Q A L M L L L W T G A L L G H G S C Q  
 61 AACAACGCCGGCGGCCAGAGGAGGGCTCCCCAGACCCTGACATCACAGGGGCACCAGTG  
 N N A G G P E E G S P D P D I T G A P V  
 121 GAGGAGGAGGATCCTTTCTCAAGGTCCCTGTGAACAAGCTGGCAGCGGCCGTCTCCAAC  
 E E E D P F L K V P V N K L A A A V S N  
 181 TTTGGCTATGACCTGTACCGCGGAAATCCAGCATGAGCCCCACCGCCAATGTGCTCCTG  
 F G Y D L Y R A K S S M S P T A N V L L  
 241 TCCCCACTC**AGCGTGGCCACAGCACTCTCTG**CCCTTTGCTGGGGGCGGAACAGCGGACA  
 S P L S V A T A L S A L S L G A E Q R T  
 301 GAGTCCAGATTACCTGGCTCTCTACTACTGACCTGATCAAGAACCCAGACATCCACGGC  
 E S S I H L A L Y Y D L I K N P D I H G  
 361 ACCTACAAGGAACTCCTTGCCTCCGTCACTGCCCCAATAAGAAGCTTCAAGAGCGCTTCC  
 T Y K E L L A S V T A P N K N F K S A S  
 421 **CGAATCATCTTCGAGAAGAAGCT**GCATCAAATCCAGCTTTGTTACACCACTGGAGAAG  
 R I I F E K K L R I K S S F V T P L E K  
 481 TCATATGGGACCAGGCCCAAGATCCTGACTGGCAACTCTCGCACGGATCTTCAGGAG**ATT**  
 S Y G T R P K I L T G N S R T D L Q E I  
 541 **AACAAGTGGGTGCAGGCC**CAGATGAAAGGGAAAATTGCTAGGTCCACAAGGGAAGTGCCC  
 N N W V Q A Q M K G K I A R S T R E V P  
 601 AGTGAAT**CAGCATTCTCCTTCTCGGTGTG**GCTTACTTCAAGGGGCAGTGGGTAACAAAG  
 S E I S I L L L G V A Y F K G Q W V T K  
 661 TTTGACTCCAGAAAGACTTCCCTCCAGGATTTCCACTTGGATGAGGAGAGGACCGTGACA  
 F D S R K T S L Q D F H L D E E R T V T  
 721 GTCCCCACGATGTCAGATCCGAAGGCCATTCTACGCTACGGCTTGGATTCTGATCTCAAC  
 V P T M S D P K A I L R Y G L D S D L N  
 781 TGTAAGATCGCCAGCTACCCCTGACCGGAAGCATGAGCATCGTCTTCTTCTGCCTCAG  
 C K I A Q L P L T G S M S I V F F L P Q  
 841 AAAGTGACCCAGAACCTGACCATGATAGAAGAGAGCCTCACCTCCGAGTTCCTTCATGAC  
 K V T Q N L T M I E E S L T S E F L H D  
 901 ATAGACCGAGAGCTGA**AGACTGTGCAGGCAGTCCTGACC**CATCCCCAAGCTGAAGCTGAGT  
 I D R E L K T V Q A V L T I P K L K L S  
 961 TATGAGGGTGAAGTCACTAAGTCCCTGCAGGAGATAAAGCTGCAATCCTTGTGTTGATTCA  
 Y E G E V T K S L Q E I K L Q S L F D S  
 1021 CCAGACTTTAGCAAGATCACAGGCAAACCTCTCAAGCTTACTCAAGTGGAACATCGTGCT  
 P D F S K I T G K P L K L T Q V E H R A  
 1081 GGCTTTGAGTGAATGAGGATGGGGCAACCAACCCAGCCAAGGGCCCCAGCCTGCCAC  
 G F E W N E D G A T N P S Q G P Q P A H  
 1141 CTCACCTTCCCTTGGACTACCACCTTAACCAACCTTTCATCTTTGTACTGAGGGACACG  
 L T F P L D Y H L N Q P F I F V L R D T  
 1201 GACACAGGGGCCCTTCTTTCATAGGCAAATCTGGACCCAGGGGCACT**TAAT**GCTCT  
 D T G A L L F I G K I L D P R G T \*  
 1261 AGCTTAATGTTCAAATA**CCCTAGATGAAGAAAACCTAGAG**GGATGGCAGATTATATATT  
 1321 ACGTGAAGGCTGCCCTATAATGTTTCAATGTATCCTTTTTCAATAAAAGTGCTTTATCCTT

Figure 8

**Figure 9. Comparaison de la séquence d'acides aminés de PECAM1 équin.** La séquence en acides aminés de PECAM1 équin est identique à 71% à la séquence bovine (NM\_174571), à 75% à la séquence porcine (NM\_213907), à 72% à la séquence humaine (AF281301), à 76% à la séquence canine (XM\_848326), à 72% à la séquence de l'aurochs (D82082), à 56% à la séquence du rat (BC104711) et à 54% à la séquence murine (AK169431). Un ombrage noir montre les acides aminés identiques chez toutes les espèces. Un ombrage gris foncé montre les acides aminés identiques chez sept ou six espèces et un ombrage gris pâle montre les acides aminés identiques chez cinq espèces. Les espaces (-) ont été introduits afin d'obtenir un alignement optimal entre les séquences.

## PECAM1

		*	20	*	40	*	
Équin	:	NHQGTAREGKMWTRVILMLLDCSSLEGOENSETTINSILMKIIPROTVQNG	:	50			
Canin	:	NQLELTQEGKMWLGAILLMLLDCSSLEGOENSETTINSILMLIIPGEEVQNG	:	50			
Aurochs	:	NQLRITQRGKMWLGAILLMLLDCSSIKGOENSETTINSILMCIIPHSTVQNG	:	50			
Bovin	:	NQLRITQRGKMWLGAILLMLLDCSSIKGOENSETTINSILMCIIPHSTVQNG	:	50			
Porcin	:	NRLRITQSGKMWLGAILMLLDCSSLEGOENSETTINSILHMETIPGQEVHNG	:	50			
Humain	:	NQPRITAQGATMWLGAILMLLDCSSLEGOENSETTINSVLEKSIIPDWTVQNG	:	50			
Murin	:	-----MLIALGLMLVLYASLQAEENSETTINSILHMSIIPSWEVYNG	:	40			
Rat	:	-----MLIALGLMLVLYASLQAEENSETTINSILHMSIIPSWEVSYNG	:	40			
		*	60	*	80	*	100
Équin	:	ENLTLQCLVDVSTTSRVKLRHSLLFYKDDVLFYVNVSSIENTESYVILPQAR	:	100			
Canin	:	ENMTLQCLVDISTTSHKLRQHVLFYKDDVLFHNVSSVENTESYVILPQAR	:	100			
Aurochs	:	ENLTLQCLVDVSTTSRVKLRHCVLFYKDDVLFHNVSSRRNTESYVILPHVR	:	100			
Bovin	:	ENLTLQCLVDVSTTSRVKLRHCVLFYKDDVLFHNVSSRRNTESYVILPHVR	:	100			
Porcin	:	ENLTLQCLVDVSTTSRVKLRQHVLFYKDDVLFHNVSSTKNTESYVILSEAR	:	100			
Humain	:	KMLTLQCLVDVSTTSHKLRQHVLFYKDDVLFYVNISSMKSTESYVILPEVR	:	100			
Murin	:	QMLTLQCLVDISTTSKRSRQHVLFYKDDVLYVNVTSREHTESYVILPQAR	:	90			
Rat	:	QMLTLQCLVDISTTSKRSRQHVLFYKDDVLYVNVSSSEHTESYVILPQSR	:	90			
		*	120	*	140	*	
Équin	:	VYDAGTYKCSVILNNKOKTTIPEYQVIVKGVPRERVILDKKREIIEGGIVIV	:	150			
Canin	:	VYDAGTYKCSVILNNKEKTIPEYQVIVKGVSIPIVILDKKREIIEGGVVKV	:	150			
Aurochs	:	VCDSGRYKCSVILNNKEKTIPEYQVIVKGVSIPIRVILDKKREIIEGGVWV	:	150			
Bovin	:	VCDSGRYKCSVILNNKEKTIPEYQVIVKGVSIPIRVILDKKREIIEGGVWV	:	150			
Porcin	:	VYNSGRYKCSVILNNKEKTIPEYQVIVKGVSIPIRVILDKKREIIEGGVVKV	:	150			
Humain	:	IYDLSGYKCSVIVNNKEKTIPEYQVIVKGVPSPIRVILDKKREIQGGIVRV	:	150			
Murin	:	VYHSGRYKCSVILNNKEKTIPEYQVIVKGV-----	:	119			
Rat	:	VYHAGRYKCSVILNNSKEKTIPEYQVIVKGVPMPEVTVDRKREIIEGGIVIV	:	140			
		*	160	*	180	*	200
Équin	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Canin	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Aurochs	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Bovin	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Porcin	:	IQCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Humain	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	200			
Murin	:	-----	:	-			
Rat	:	NCSVPEERAPVHFTIEKLELNRGKRRREKTSQKQNFVILEFTVEEQDR	:	189			
		*	220	*	240	*	
Équin	:	LISFHCOASIVSGNRVETSESSRSSELVTVTESFSNPKFHVSPQCKIIEGE	:	250			
Canin	:	VLEFQCOARTISGTHMETSRAIKSELVTVTESFSNPKFHVSPQCKIIEGD	:	250			
Aurochs	:	IIRFQCOAKIIFSGSNVESSRFIQSELVTVRESFSNPKFHIIPEGKVIIEGD	:	250			
Bovin	:	IIRFQCOAKIIFSGSNVESSRFIQSELVTVRESFSNPKFHIIPEGKVIIEGD	:	250			
Porcin	:	VILFSCOANVIEGTRVEISDSVRSQVTVRESFSNPKFHIIPEGKVIIEGD	:	250			
Humain	:	VLSFRCOARTISGTHMETSSTKSELVTVTESFSNPKFHIIPEGKVIIEGD	:	250			
Murin	:	-----ESFSNPKFIIKPEGMIIIEGD	:	139			
Rat	:	IIVFRCOAGVLSGKIKMOTSEFIRSEYVTVQEFESNPKFQIQPPEMIIIEGN	:	239			

Figure 9

```

                260                280                300
Équin : QLRIRCTIIVRHILQCFEIIIIQDKRIVAFSRHGSEAVYSVMAMMEHNG : 299
Canin : QLYIRCTIIVRHILQCFEIIIIQDKRIVAFKRHGNEATYSVMAMAEHNG : 300
Aurochs : ELQVRCIVQVTHIQACSFPEIIIIQDKREIVAFNSLSSEAVYSVMATTEHNG : 300
Bovin : ELQVRCIVQVTHIQACSFPEIIIIQDKREIVAFNSLSSEAVYSVMATTEHNG : 300
Porcin : QLLIRCTIIVRHILQACSFPEIIIIQDKREIVAFSRNGSEAVYSVMATVEHNS : 300
Humain : QLHIRCTIIVRHILQCFEIIIIQDKRIVAFNRHGKNAVYSVMAMVEHNSG : 300
Murin : QLHIRCTIIVRHILQCFEIIIIQDKRIVATSKQSSEAVYSVMAMVEYSG : 188
Rat : QLHIRCSVQVPHILQCFEIIIIQDKRIVATSKQSKNAVYSVMALVEHNSG : 289

```

```

                320                340
Équin : NYTCKVEASRISKVTSIMVNITELFERPKLESPTIRLDGGSLDLKCSIP : 349
Canin : NYTCKVEASRISKVSSIVVNITELFERPKLESSITRLDGGESLNLKCSIP : 350
Aurochs : NYTCKVEASRISKVSSVVVNITELFERPKLESSATRLDGGELNLKCSIP : 350
Bovin : NYTCKVEASRISKVSSVVVNITELFERPKLESSATRLDGGELNLKCSIP : 350
Porcin : NYTCKVEASRISKVSSIMVNITELFERPKLESSATRLDGGESLRLKCSIP : 350
Humain : NYTCKVESRISKVSSIVVNITELFERPKLESSATRLDGGERLNLKCSIP : 350
Murin : HYTCKVESRISKVSSIMVNITELFERPKLESSATRLDGGELDLKCSVVS : 238
Rat : HYTCKVESRISKVSSILVNITELFERPKLESSATRLDGGMLDLKCSVVS : 335

```

```

                360                380                400
Équin : GAPTANFTIQKGHIVVSCQIFTKLASKWESGIYTCIAGIEKVVKKSNT : 399
Canin : EAPPANFTIQKENTIVSCQNETKLASATDSGIYTCNASMGKVVKRSSA : 399
Aurochs : GAPPANFTIQKGSMTIVSCIQNETKRVSEKDSGLYTCVAGVGRVEKRSNT : 399
Bovin : GAPPANFTIQKGGMTIVSCIQNETKRVSEKDSGLYTCVAGVGRVEKRSNT : 399
Porcin : GAPPEANFTIQKGGMMIQIQNETKVASERISGIYTCVAGIEKVVKRSNE : 400
Humain : GAPPANFTIQKEDIVVSCIQDFTKLASKSDSGIYTCIAGIEKVVKKSNT : 399
Murin : GTPVANFTIQKEETVLSQIQNETSKLAEESDSGEYSCTAGIEKVVKRSSL : 297
Rat : GAPVANFTIQKEETVLSQIQNETSKLAEERDSGLYSCIAGIEKVVKRSSL : 388

```

```

                420                440
Équin : VOIIVCEMLSRRPRLHDSSEVIRKQOTIEVSCQSIINGTPIPIYQLLRANK : 448
Canin : VOIIVCEMLSRRPRLHDSSEVIRKQOTIEVSCQSIINGTPIPIYHLLRITSK : 449
Aurochs : VOIIVCEMLSRRPRLHDSREVIRKQOTIEVSCQSVNGTAPIEYQLSNTSK : 449
Bovin : VOIIVCEMLSRRPRLHDSREVIRKQOTIEVSCQSVNGTAPIEYQLSNTSK : 449
Porcin : VOIIVCEMLSRRPRLHDSSEVIRKQOTIEVSCQSIINGTSPISYQLLRGSD : 450
Humain : VOIIVCEMLSRRPRLSYDAQSEVIRKQOTIEVRCESISGTLPIPIYQLLRITSK : 449
Murin : VEIQVCEMLSRRPRLHDAKSEIIRKHAIGISCOENGTAPIPIYHLLRKAIS : 337
Rat : VEIQVCEMLSRRPRLHDAKSEIIRKQOIIIGISCOVNGTAPIPIYRLLRAKS : 438

```

```

                460                480                500
Équin : VIKSHNLSNNEPAVFKDNPTRDVEYQCIVDNCHSHSKMVEVLRVKVIAP : 499
Canin : ILESRISSNNEPAVFKDNPTRDVEYQCIVDNCHSHSEMVEVLRVKVIAP : 499
Aurochs : EVANQSVGSNKPATFRVKPTRDVEYCCSADNCHSHSKMESEVLRVKVIAP : 499
Bovin : EVANQSVGSNKPATFRVKPTRDVEYCCSADNCHSHSKMESEVLRVKVIAP : 499
Porcin : ILASQKVSNNNEPAVFKDNPTRDVEYQCIVADNCHSHAGMESEVLRVKVIAP : 500
Humain : VLENSTKNSNNEPAVFKDNPTRDVEYCCVADNCHSHAKMLSEVLRVKVIAP : 499
Murin : EFQTLVTSNNEPATFRDKPTRDVEYCCRADNCHSHPAVSEIILRVRVIAPI : 397
Rat : NFQTVQKNSNNEPWFDFDKPTRDVEYQCIVDNCHSHPEVRSIILRVKVIAP : 488

```

Figure 9



```

      *           520           *           540           *
Équin   : VEEVKLSIILLTEVVEIGKEIVLRCSVNRKASGPITYITFYREKEKPKPFYCVI : 548
Canin   : VDEVKLSIIMKAEVVEIGKEIVLRCSVNRKATGPITYRIFYRKA-GSLLLYCIT : 548
Aurochs : VDEAQL-VVLKGEVESGEEIVFYCSVNEGSGPITYKIFYREKESKPPFYCIT : 548
Bovin   : VDEAQL-VVLKGEVESGEEIVFYCSVNEGSGPITYKIFYREKESKPPFYCIT : 548
Porcin  : VEEVKLSIILLSEEVESGQAVLVCQSVKEGSGPITYKIFYREKESKPPFYCIT : 550
Humain  : VDEVQISIISSKVVESGEEIVLVCQAVNEGSGPITYKIFYREKESKPPFYCIT : 549
Murin   : VDEVVISIILSSNEVQSGSEMVLRCVMEGTSPIITFQIFYREKERPRPFHCAV : 437
Rat     : VDEVVISIILSGNEVQSGSEMVLRCVMEGTEGPVTFQIFYREKESGRPFHEET : 538

```

```

      *           560           *           590           *           600
Équin   : SNETQATWVESQSKQEGEYOYCIASNRANLARKVPCSNALITVRVVELSPW : 598
Canin   : SNETHAVWYKSKQSKQEGEYOYCIASNRANRLSSPQSNVLTIVRVELAPW : 598
Aurochs : INATQIMWKTIDSKQYEGYOYCIASNRANLSKHVICSNILITVRVYLAPW : 598
Bovin   : INATQIMWKTIDSKQYEGYOYCIASNRANLSKHVICSNILITVRVYLP-L : 597
Porcin  : INETQAIWKPKQSKQEGEYOYCIASNRATPSKNTLQSNILAVRVYLAPW : 600
Humain  : SNETQAFWTKQKSKQEGEYOYCIASNRANHASSVPRSKILITVRVYLAPW : 599
Murin   : VNETQAFWTKQKSKQEGEYOYCIASNRASSMRTSPRSSILAVRVYLAPW : 487
Rat     : VNETQVEWHEQTSKQEGEYOYCIASNRAS-IWTSLRSGELITVRVYLAPW : 587

```

```

      *           620           *           640           *
Équin   : EKGLIAVVVIQVILIALLLILGARYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNN : 648
Canin   : IKGLIAVVVIQVILIGVILILGARYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSIN : 648
Aurochs : EKGLIAVVVIQVILIVLVLGAKQYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNN : 648
Bovin   : EKGLIAVVVIQVILIVLVLGAKQYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNN : 647
Porcin  : EKGLIAVVVIQVILIAVLLILGARYELRKS KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNN : 650
Humain  : EKGLIAVVVIQVILIALLLIAKQYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNN : 649
Murin   : EKGLIAVVVIQVILIALLIVAKQYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNS : 537
Rat     : EKGLIAVVVIQVILIALLIVAKQYELRKA KAKQKPVEMSRPAVPLLNSNS : 637

```

```

      *           660           *           680           *           700
Équin   : EKILSDPNTETANRHYGYSEDVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTS : 698
Canin   : EKILSDPNTETANRHYGYNEDEVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTS : 698
Aurochs : EKILSDAGTEADRHYGYNEDEVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTS : 698
Bovin   : EKILSDAGTEADRHYGYNEDEVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTS : 697
Porcin  : EKILSDPNTETANRHYGYNEDEVGNHAMKPLNENKEPLTLDVEYTEVEVTS : 700
Humain  : EK-MSDPKMEANSHYGHNEDEVGNHAMKPLNENKEPLKSDVQYTEVQVSSA : 698
Murin   : EK-ISEPSVEANSHYGYDQVSGNCAVKPINQKCFQNMDDVEYTEVEVSSL : 586
Rat     : EK-VSEPSVEINSHY-----DSQNMDDVEYTEVEVSSL : 668

```

```

      *           720           *           740           *
Équin   : EPHQGLGTRG--TETVYSEIRKADPDEVENRYSRTEGSLDGT----- : 738
Canin   : EPYQGLETRG--TETVYSEIRKANPDEVENRYSRTEGSLDGT----- : 738
Aurochs : EPHQGLGTRG--TETVYSEIRKADPDEVENRYSRTEGSLDGS----- : 738
Bovin   : EPHQGLGTRGTE--TETVYSEIRKADPDEVENRYSRTEGSLDGS----- : 739
Porcin  : EPHRGLGTRG--TETVYSEIRKADPDEVENRYSRTEGSLDGT----- : 740
Humain  : ESHKILGTRD--TETVYSEVRKAMPDAVESRYSRTEGS----- : 734
Murin   : EPHQALGTRA--TETVYSEIRKADPDEVENRYSRTEGSLNGT----- : 626
Rat     : EPHQENGRLP----- : 678

```

Figure 9

**Figure 10. Comparaison de la séquence d'acides aminés de PI10 équin.** La séquence en acides aminés de PI10 équin est identique à 62% à la séquence prédite bovine (XM\_864651), à 60% à la séquence humaine (BC096219), à 62% de la séquence prédite canine (XM\_541071), à 56% à la séquence chez le rat (BC061735) et à 58% à la séquence murine (NM\_198028). Un ombrage noir montre les acides aminés identiques chez toutes les espèces. Un ombrage gris foncé montre les acides aminés identiques chez cinq espèces et un ombrage gris pâle montre les acides aminés identiques chez quatre espèces. Les espaces (-) ont été introduits afin d'obtenir un alignement optimal entre les séquences.

## PI10

```

      *           20           *           40           *
Équin : MDSLAKSINQFALEFESKKLAESAEGKNIFFSPWGISLISLAMVYLGKRGTT : 50
Bovin : MDELAKSINQFALEFESKKLAESAEGKNIFFSPWGISLISLAMVYLGKRGTT : 50
Canin : MDSLAKSINQFALEFESKKLAESAEGKNIFFSPWGISLISLAMVYLGKRGTT : 50
Humain : MDSLATSINQFALEFESKKLAESAQGNIFFSSWSLISLITIVYLGKRGTT : 50
Murin : MASLAVSINQFALEFESKKLAESAEGRNIFFSPWGISLISLAMVYLGKRGTT : 50
Rat : MASLAVSINQFAVEFESKKLAESAEGRNIFFSPWGISLISLAMVYLGKRGTT : 50

      60           *           80           *           100
Équin : AAQMAQVLFQFRIDQIRSFHSEKKRKMENLWVVEEIHSHNFOTLISEIN : 100
Bovin : AAQMAQVLFQFRIDQSKFCPISEKKRKMENLVGKEEELYSDFOTLISEIN : 100
Canin : AAQMAQVLFHFSRDKIDLKSCEPESEKKRKMENGLGRVEEIHSHNFOTLISEIN : 100
Humain : AAQMAQVLFQFRIDQGVKCEPESEKKRKMENLNSKSEEHSHNFOTLISEIL : 100
Murin : AAQMAQVLFQFSSVEDEKSCPESEKKRKMENSGKFEELQSDFFOTLASEIL : 100
Rat : AAQMSQVLFHFGSIQDEKFGPESEKKRKMENSGKFEELQSDFFOTITAKIL : 100

      *           120           *           140           *
Équin : NCKNAYILKTIANRIVYPEKTHEFFLIKYLEDMKIYFGAEPQSVNFVEASGRV : 150
Bovin : SSSHACILKTIANRIVYGEKTEFFHKKYLEDVKIYFGAEPQSVNFVEASGCI : 150
Canin : KPSTSYVLKTIANRIVYGEKTYEHHIKYLEDMKIYFGAEPQSVNFVGAAGCI : 150
Humain : KPNDIYLLKTIANRIVYGEKTYEHHIKYLEDMKIYFGAEPQSVNFVEASGCI : 150
Murin : KPGNSYVLKTIANRIVYGEKTYEHHIKYLEDMKIYFGAEPQSVNFVEASGCI : 150
Rat : KHGNSYVLKTIANRIVYVEKTYEHHIKYLEDMKIYFGAEPQSVNFVEASGCI : 150

      160           *           180           *           200
Équin : RKEINSWVESQTEGKIENLLPDDSVAPTIRMVVLVNALYFKGIWEHQBSVQ : 200
Bovin : RKEINSWVEKQTEGKIENLLPDDAVDPITIRMVVLVNALYFKGVWEHQBSVQ : 200
Canin : RKEINSWVESQTEGKIENLLPDDAVDSATIRMVVLVNALYFKGIWEHQBSVQ : 200
Humain : RKEINSWVERQTEGKIENLLPDDSVDSITIRMVVLVNALYFKGIWEHQBSVQ : 200
Murin : RKEINSWVGSQTEGKIENLLPDDSVDTKIRMVVLVNALYFKGIWEHQBSVK : 200
Rat : RKEINSWVGSQTEGKIENLLPDDAVDKKTIIRMVVLVNALYFKGIWEHQBSVQ : 200

      *           220           *           240           *
Équin : DTTEKIFRINKTTSKPVOMMSMKKLOVHFVENFQVIGLQLYYENRDIISL : 250
Bovin : NTEKSFKINKTTSKPVOMMSMKKLOVHYLESFCAMGLQLYYESRDIISL : 250
Canin : DTTEKIFRINKTTSKPVOMMSMKKLOIFHIEKPCQVIGLQLYYENRDIISL : 250
Humain : NTEKIFRINKTTSKPVOMMSMKKLDHIFHIEKPKAVGLQLYYKSRDIISL : 250
Murin : STTERIFRVNKTTSKPVOMMSMKOSLOVHFIEBELQVIGLQLYYQNRDIISL : 250
Rat : NTERIFRINKTTSKPVOMMSMKOSLOVHFIEBELQVIGVQLHYQNRDIISL : 250

      260           *           280           *           300
Équin : LILLPEIVGGLQLEKAITYEKISEWTSADMMELYEVQDHLPRFKLEISY : 300
Bovin : LILLPEIVGGLQLEKAITYEKISEWTSADMMELCNVQDHLPRFKLEISY : 300
Canin : LVLLPEIVGGLQLERAITYEKISEWTSADMMELYEVQDHLPRFKLEISY : 300
Humain : LILLPEIVGGLQLEKAITYEKISEWTSADMMELYEVQDHLPRFKLEISY : 300
Murin : LLLLPEIVGGLQLERAITYEKISEWTSADMMELYEVQDHLPRFKLEISY : 300
Rat : LLLLPEIVGGLQLERAITYEKISEWTSADMMELYEVQDHLPRFKLEISY : 300

```

Figure 10

```

      *           320           *           340           *
Equin  : LNKISQECLEWTETTYFCPRFSTSLDLKSTLSNMGMSDALTRAKL----- : 343
Bovin  : DLKSTLSSMGMSDAFN-QSKADFSGMSSEARNLELSNVFHKCFVVEINEQGT : 349
Canin  : DLKSSLRSMGMSDAFN-QGKADFSGMSMEGNLELSNVFHKSELEINEQGT : 349
Humain : DLKSTLSSMGMSDAFS-QSKADFSGMSSEARNLELSNVFHKAFVEINEQGT : 349
Murin  : DLKSAIRCMGMTDVFQ-QSKADFSNMTSERNLELSNVFHKILEINEEGT : 349
Rat    : DLQSAIRCMGMTDAFN-QGKANFSNMTSERNLELSNVFHKILEINEEGT : 349

      360           *           380           *
Equin  : ----- : -
Bovin  : EAAAGTGSEVSVRMKLPSELEFNADHPLELEIRHNKINGILLFYGRFCSP : 397
Canin  : EAAAGSGSEVSIKRLPELEFNANHPLELEIRHNKTASILLFYGRFCSP : 397
Humain : EAAAGSGSEIDIRIRVPSLEFNANHPLELEIRHNKINTLLFYGRFCSP : 397
Murin  : EAAAGTGSEISVRIKAPSLELVNADHPLELEIRHNKIKSILLFCGRFCSP : 397
Rat    : EAAAGTGSEVNERIKAPSLELVNADHPLELEIRHNVTINTLLFYGRFYSP : 397

```

Figure 10

**Figure 11. Comparaison de la séquence d'acides aminés de PEDF équin.** La séquence en acides aminés de PEDF équin est identique à 87% à la séquence bovine (BC112656), à 87% à la séquence porcine (DQ789896), à 87% à la séquence humaine (NM\_002615), à 88% à la séquence prédite canine (XM\_848921) et à 84% de la séquence murine (AF017057). Un ombrage noir montre les acides aminés identiques chez toutes les espèces. Un ombrage gris foncé montre les acides aminés identiques chez cinq espèces et un ombrage gris pâle montre les acides aminés identiques chez quatre espèces. Les espaces (-) ont été introduits afin d'obtenir un alignement optimal entre les séquences.

## PEDF

```

      *           20           *           40           *
Équin : MQALVLLLVLTGALLGHGSSCONNAGGPEEGSPDPDITGAFVEEEDPFTKVP : 50
Bovin : MQALVLLLVLTGALLGFGRCON--AGQDAGSLTPESTGAFVEEEDPFTKVP : 49
Porcin : MQALVLLLVLTGALLGSGSSCON--AGPEEGSPAPDITGAFVEEEDPFTKVP : 48
Humain : MQALVLLLVLTGALLGHSSCONPASPEEGSPDPDITGAFVEEEDPFTKVP : 50
Canin : MQALVLLLVLTGALLGHSSCONDAGGPOEISAPDITGAFVEEEDPFTKVP : 50
Murin : MQALVLLLVLTGALLGHGSSCON--VPSSEGSVPDSTGAFVEEEDPFTKVP : 49

```

```

      *           60           *           80           *           100
Équin : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRKSSMSPDANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 100
Bovin : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRSGESPTANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 99
Porcin : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRSESPTANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 99
Humain : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRSSISPTANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 100
Canin : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRSSISPAANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 100
Murin : VNKLAAAVSNFGYDLYRIRSSASPTANVLLSPLSVATALSALSGLGAEORT : 99

```

```

      *           120          *           140          *
Équin : ESSIHRLALYYDLISNPDIHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 150
Bovin : ESSIHRLALYYDLISNPDIHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 148
Porcin : ESSIHRLALYYDLISNPDLHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 148
Humain : ESSIHRLALYYDLISNPDIHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 150
Canin : ESSIHRLALYYDLISNPDIHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 150
Murin : ESSIHRLALYYDLISNPDIHGTYSKELLASVTAPKKNKKSASRIIFEKKLRI : 149

```

```

      *           160          *           180          *           200
Équin : KSSFVAPLEKSYGTRPKILTGNRSRIDLOEINNWWVQAQKKGKLARSTREVP : 200
Bovin : KSSFVAPLEKSYGTRPRILTGNRSRIDLOEINNWWVQAQKKGKVARSTREMP : 198
Porcin : KSSFVAPLEKSYGTRPRILTGNRSRIDLOEVNWWVQAQKKGKVARSTRELP : 198
Humain : KSSFVAPLEKSYGTRPRVLTGNRSRIDLOEINNWWVQAQKKGKLARSTREIP : 200
Canin : KSSFVAPLEKSYSTRPRILTGNRSRIDLOEVNWWVQAQKKGKLARSTREIP : 200
Murin : KSSFVAPLEKSYGTRPRILTGNRSRIDLOEINNWWVQAQKKGKLARSTREMP : 199

```

```

      *           220          *           240          *
Équin : SEISIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTSLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 250
Bovin : SEISIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTSLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 248
Porcin : SEISIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTSLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 248
Humain : SEISIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTSLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 250
Canin : SEISIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTSLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 250
Murin : SALSIDLLGVAFKFGQWVTKFDSRKTTLQDFHLDEERTVIVPMMSDPKAV : 249

```

```

      *           260          *           280          *           300
Équin : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 300
Bovin : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 298
Porcin : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 298
Humain : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 300
Canin : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 300
Murin : LRYGLSDILNCKIAQLPLTGSMSIIFFLPKVTONLTMIEESLTSEFIHD : 299

```

```

      *           320          *           340          *
Équin : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGEVTKSLQEMKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 350
Bovin : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGELTKSVQELKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 348
Porcin : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGELTKSVQELKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 348
Humain : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGEVTKSLQEMKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 350
Canin : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGEVTKSLQEMKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 350
Murin : IDRELKTQAVLTIKPKKLSYEGELTKSLQEMKQLQSLFDSPDFSKITGKP : 349

```

Figure 11

```

          360          *          380          *          400
Équin  : LKLTQVEHRAAGFEWNEEG-AIKNESQGEQPAHLTFPLDYHLNQPFFIFVLRD : 399
Bovin  : IKLTQVEHRAAGFEWNEEGAGIKNSSEGVQPARLTFPLDYHLNQPFFIFVLRD : 399
Porcin : IKLTQVEHRIAGFEWNEEGGSATSSFG---PRLTFPLDYHLNQPFFIFVLRD : 399
Humain : IKLTQVEHRAAGFEWNEEGAGITFSPGLQPAHLTFPLDYHLNQPFFIFVLRD : 400
Canin  : IKLTQVEHRAAGFEWNEEGAGITFSPGLQPTRLTFPLDYHLNRPFFIFVLRD : 400
Murin  : VKLTQVEHRAAGFEWNEEGAGSSPGLQPVRLTFPLDYHLNQPFFIFVLRD : 399

          *          420
Équin  : TDTGALLFIGKILDPKGT----- : 417
Bovin  : TDTGALLFIGKILDPKGT----- : 416
Porcin : TDTGALLFIGKILDPKST----- : 413
Humain : TDTGALLFIGKILDPKGP----- : 418
Canin  : TDTGALLFIGKILDPKGI----- : 418
Murin  : TDTGALLFIGRILDPKST----- : 417

```

Figure 11

**Figure 12. Expression temporelle de PECAM1 (a), PI10 (b) et PEDF (c) lors de la guérison tissulaire chez le cheval.** Le RT-PCR a été réalisé en triplicat pour chaque gène. Les droites d'erreur indiquent l'écart type entre les trois réplicats. Les valeurs obtenues avec l'analyse par RT-PCR des différents gènes ont été normalisées avec les valeurs de GAPDH (d) correspondant. Le modèle linéaire à mesures répétées, avec le temps et le groupe comme facteurs intra-sujet a été utilisé pour vérifier l'effet du temps (\* significativement différent du temps 0) et du groupe (A significativement différent de B pour un temps) sur les résultats.



# PECAM-1

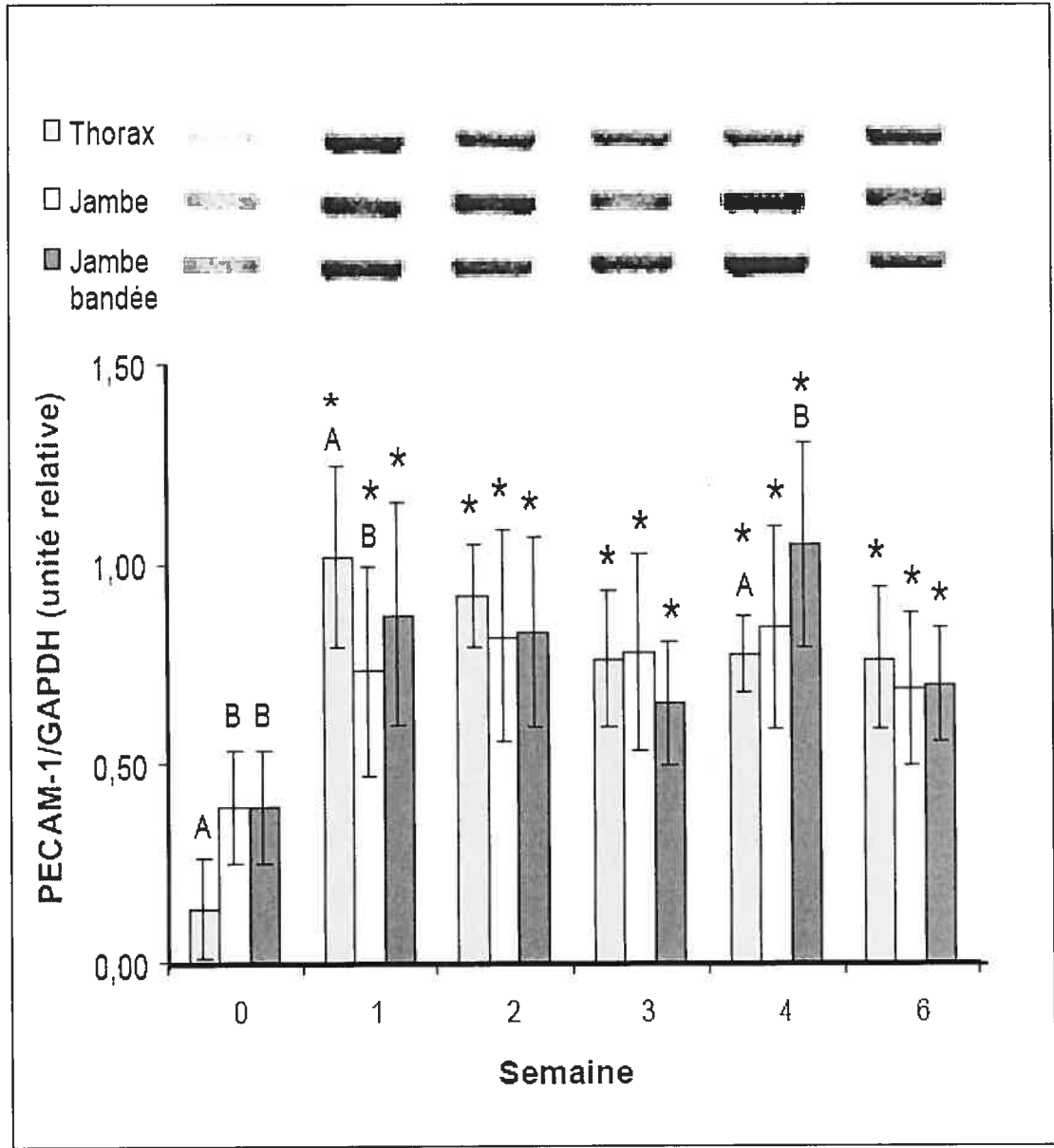


Figure 12 (a)

## PI10

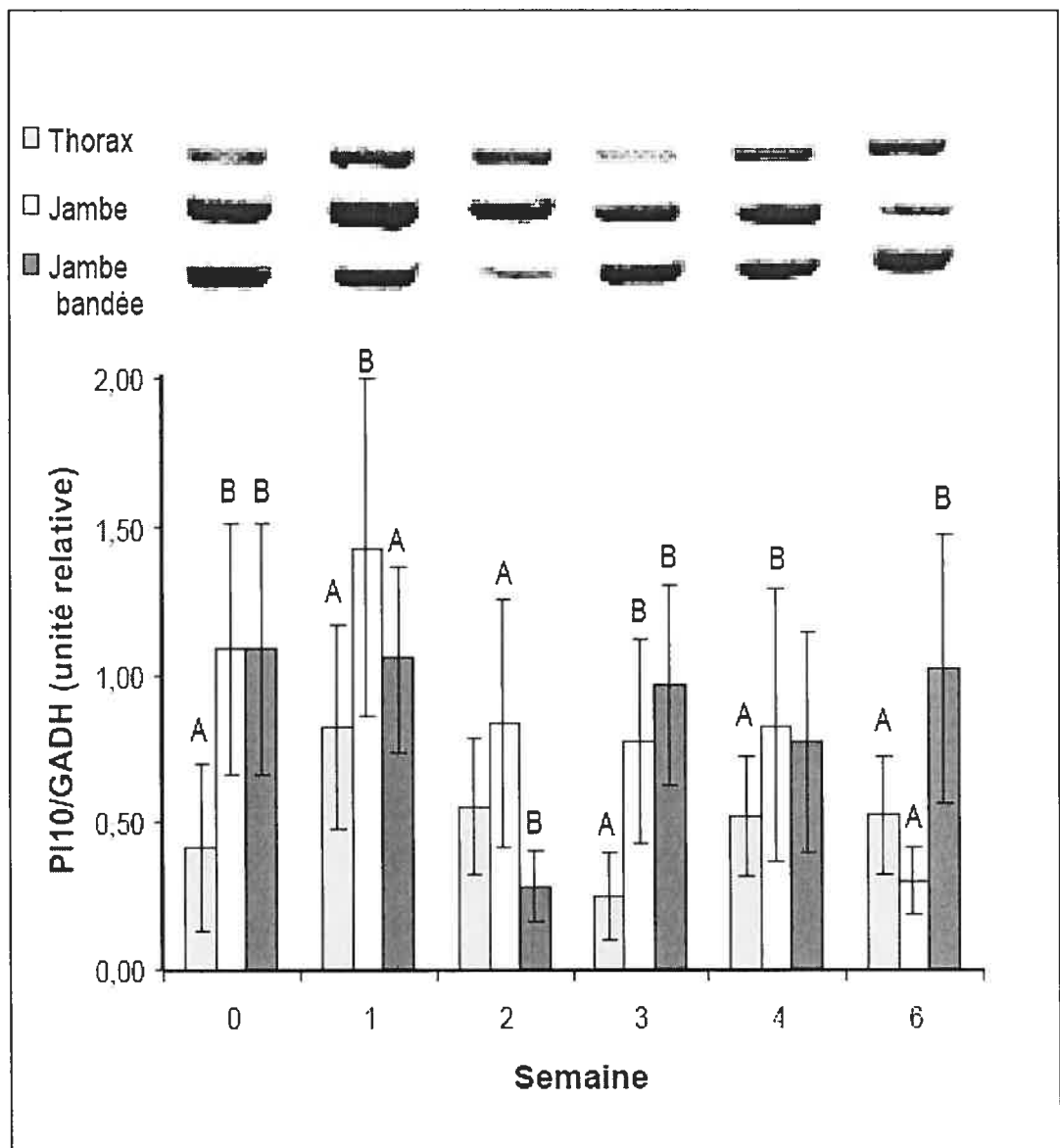


Figure 12 (b)

## PEDF

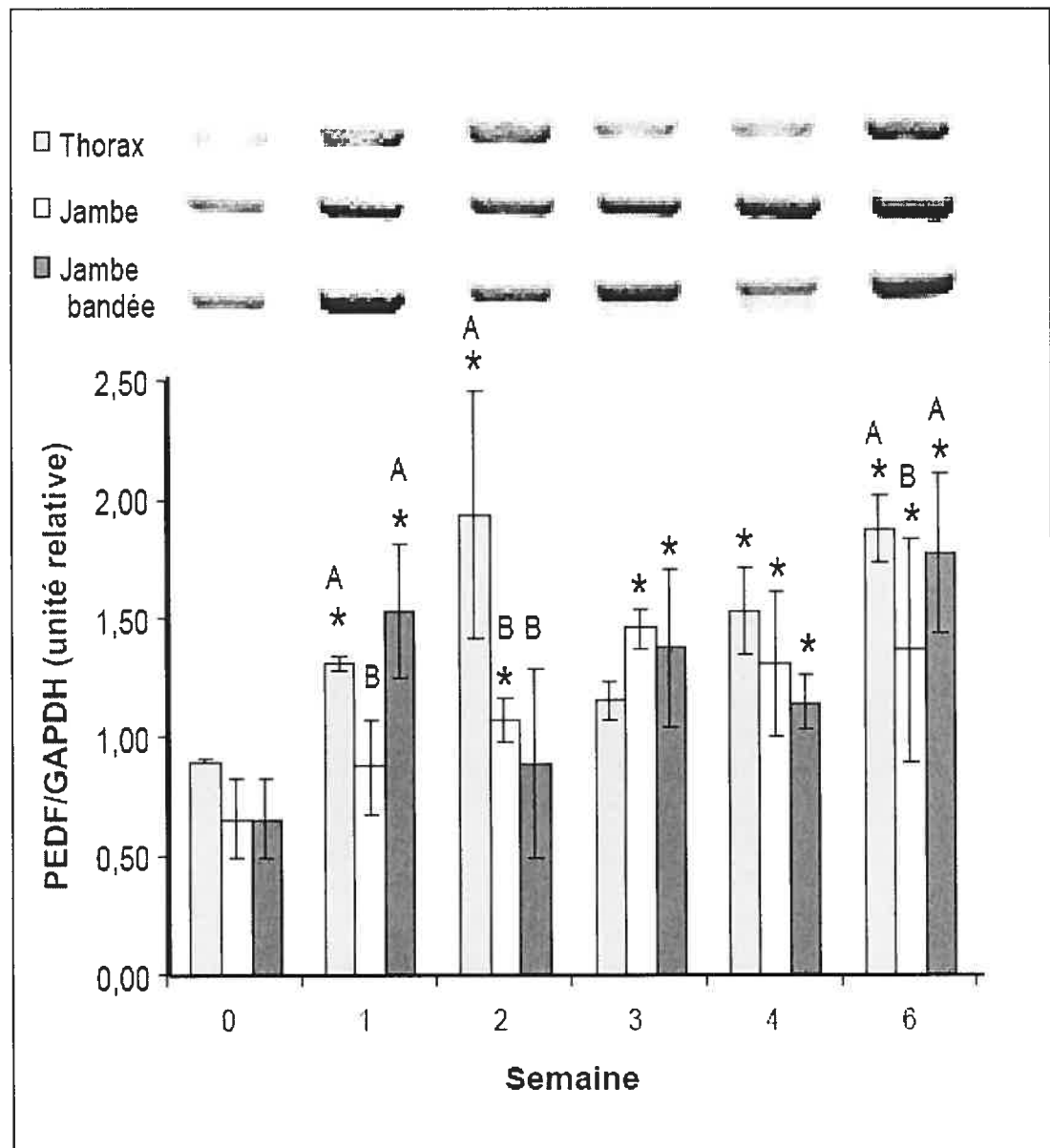


Figure 12 (c)

## GAPDH

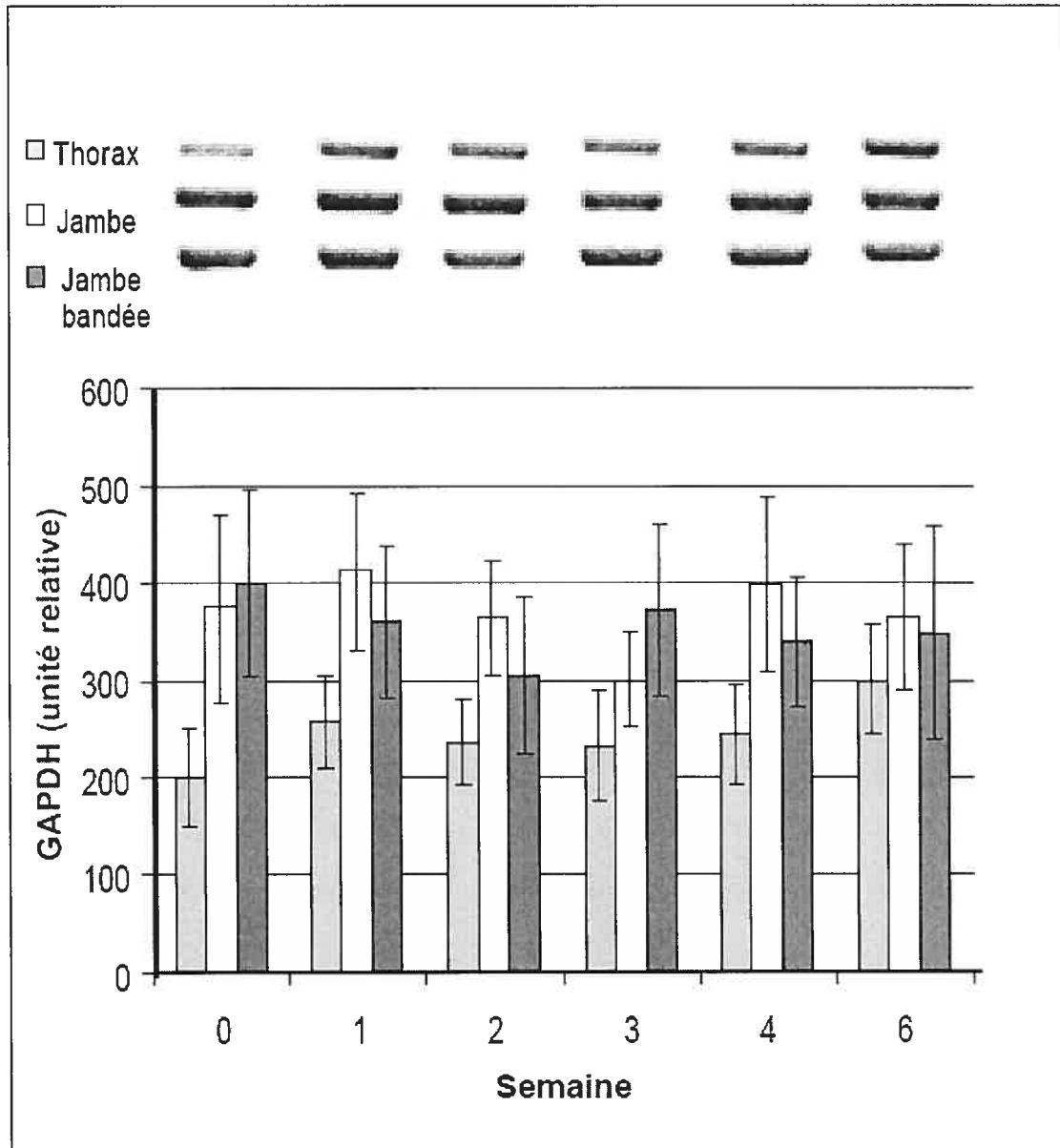
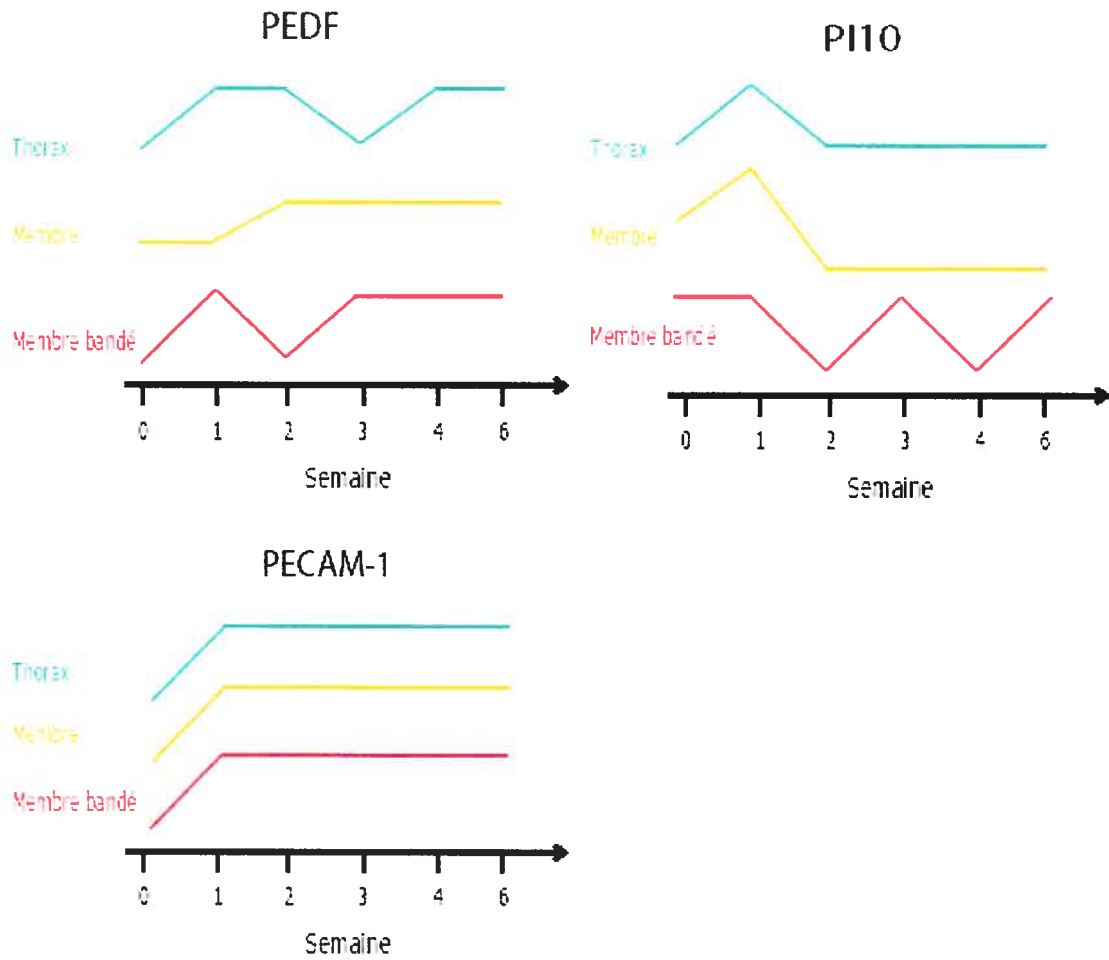


Figure 12 (d)



**Figure 13. Patron d'expression de PECAM1, PI10 et PEDF lors de la guérison tissulaire chez le cheval, résultats simplifiés.**

## Discussion

Cette étude est la première à caractériser les gènes PECAM1, PI10 et PEDF chez le cheval, ainsi que la première à déterminer l'expression temporelle de PI10 et PEDF dans un modèle de guérison tissulaire, quelque soit l'espèce animale. Elle a permis de constater que ces gènes avaient des patrons d'expression leur étant spécifique et d'élucider l'impact de ces gènes sur la guérison et vice et versa. Entre autres, PECAM1 pourrait occasionner l'allongement des phases de guérison dans le temps. D'autre part, on a pu constater une différence marquée de la séquence en acides aminés de PI10 comparativement à celle d'autres espèces. À l'opposé, PEDF est très bien conservé d'une espèce à l'autre soutenant l'importance de ce gène. De plus, son patron d'expression appuie une fonction anti-inflammatoire récemment énoncée.

La guérison tissulaire est un processus dynamique combinant des interactions cellulaires, moléculaires et physiologiques complexes dans le but de rétablir l'intégrité structurale des tissus endommagés (Theoret, 2001). Les blessures cutanées sont fréquentes chez le cheval et requièrent souvent des traitements dispendieux et prolongés, d'où l'intérêt de développer une meilleure compréhension du processus de guérison. De plus, les chevaux présentent souvent des difficultés lors de guérison de plaies situées dans la région distale des membres, notamment en ce qui a trait à la résolution de la phase inflammatoire, à la production excessive de tissu de granulation, ainsi qu'à une réépithélialisation et une contraction déficientes. Autant chez l'homme que chez le cheval, un déséquilibre dans la synthèse et l'inhibition de composantes biomoléculaires est vraisemblablement à la base de ce phénomène (Knottenbelt, 1997). En effet, une expression génique anormale pourrait être à l'origine des situations pathologiques rencontrées lors de guérison de plaie.

L'angiogenèse est un processus particulièrement intéressant lors de la guérison de plaie. Par la création de nouveaux vaisseaux sanguins elle apporte l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules qui participent à la guérison. Ce processus est de plus intimement lié à la phase inflammatoire d'où émanent plusieurs signaux pour l'angiogenèse (Li *et al.*, 2003). L'angiogenèse est un processus dynamique hautement

contrôlé qui dépend des interactions entre l'endothélium vasculaire et des signaux à la fois du sérum et de la matrice extracellulaire environnante (McColl *et al.*, 2004). On assiste donc à une série d'événements complexes dont les cascades biochimiques ne sont pas encore toutes élucidées. C'est pourquoi, parmi les gènes déterminés comme étant sur-exprimés lors de la guérison cutanée normale chez le cheval (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005), nous avons choisi d'étudier plus en profondeur trois gènes ayant possiblement un rôle durant l'angiogénèse.

Le génome de l'espèce équine étant peu connu nous avons comme premier objectif de caractériser les ADNc correspondants. Pour ce faire, l'établissement de la taille de la mini-génothèque par Northern virtuel a permis de réduire drastiquement l'effort de clonage nécessaire à l'obtention d'un clone possédant l'ADNc d'intérêt. Le séquençage des ADNc équins nous a permis de comparer le pourcentage d'identité des acides nucléiques de gènes équins avec ceux d'autres espèces. En spécifiant les espèces dont la séquence se rapproche le plus de la séquence équine on peut effectuer une meilleure sélection des modèles et études pouvant nous informer sur l'action de ces gènes chez l'équin. De plus en présentant la traduction des séquences en acides aminés il est possible de mieux comprendre l'effet des variations nucléiques sur le produit final qu'est la protéine et de prédire les différences entre espèces de cette protéine.

Pour PECAM1 équin, on peut voir que le pourcentage d'identité en acides nucléiques est élevé par rapport à l'aurochs (85%), le bovin (84%), le canin (84%), le porc (83%) et l'humain (81%) mais moins par rapport à la souris ou le rat. Les études réalisées chez l'Homme pourraient donc être les plus valables à l'interprétation de nos résultats. La séquence équine contient les seize exons qui sont aussi présents dans le PECAM1 pleine longueur prédominant chez l'Homme (Wang *et al.*, 2003). Notre étude n'exclut pas qu'il y ait des isoformes de PECAM1 chez le cheval mais dans la peau équine nous n'avons détecté que la forme pleine longueur. Ceci porte à croire que s'il ne s'agit pas de la forme unique, elle en est tout le moins la forme prédominante. À l'inverse, chez la souris l'isoforme prédominant ne contient pas les exons 14 et 15 (Sheibani *et al.*, 1999), élément appuyant l'hypothèse que les données obtenues chez l'homme seraient plus similaires à celles attendues chez l'espèce équine.

Pour PI10 équin, le pourcentage d'identité en acides nucléiques est élevé par rapport au bovin (88%), au canin (87%) et à l'humain (86%), mais lorsque l'on compare avec d'autres espèces on remarque une délétion située à l'acide nucléique 941 chez l'équin. Cette délétion cause un changement du cadre de lecture qui une fois traduit amène un codon stop prématuré comparativement aux autres espèces résultant en une protéine tronquée. Les pourcentages d'identité sont donc nettement plus faibles dans la séquence en acides aminés (figure 10). On peut remarquer aussi la présence de trois sites de polyadénylation, indiquant que ce gène subit possiblement une polyadénylation alternative. Ceci se produit lorsqu'il y a deux sites ou plus de polyadénylation dans la région 3' UTR de l'ARNm, produisant des transcrits d'isoformes de longueurs variables. (Legendre et Gautheret, 2003). Comme la partie 3' UTR peut accueillir d'importants éléments régulateurs, en affectant la stabilité, la localisation ou la traduction par exemple, la polyadénylation alternative peut affecter fortement le destin de l'ARNm et par le fait même la fonction du gène. Bien que critiques, les mécanismes du choix d'emplacement des sites de polyadénylation ne sont pas encore entièrement compris (Legendre et Gautheret, 2003). Ceci dit, bien qu'aucune colonie n'ait été marquée positive dans la mini-génothèque de PI10 pour la bande située entre 1600 et 2000 pb, la présence même de cette bande ainsi que des trois sites de polyadénylation suggère qu'il pourrait exister un isoforme plus court dérivant de ce gène chez le cheval.

Pour PEDF équin, le pourcentage d'identité en acides nucléiques est élevé par rapport au bovin (88%), au porc (88%), à l'humain (87%) au canin (87%) et à la souris (84%). Même une fois traduit en acides aminés l'homologie demeure très forte (figure 11). PEDF est donc un gène très bien conservé d'une espèce à l'autre, ce qui est un indice de la fonction primordiale de ce gène (Seringhaus *et al.*, 2006).

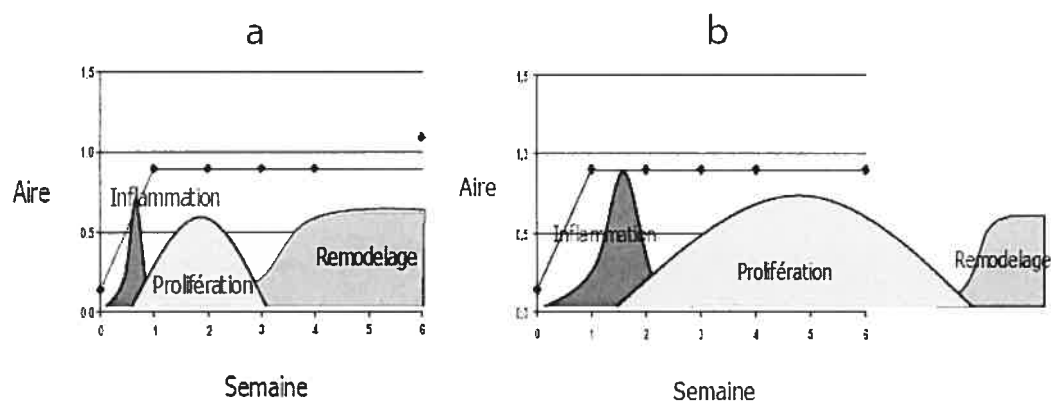
Le second objectif de l'étude a été d'analyser les différences dans l'expression des gènes cibles selon l'emplacement et l'âge de la plaie. La trousse « SMART cDNA PCR synthesis» (Clontech Lab Inc), qui requiert une faible quantité d'ARN total de départ, a permis d'obtenir un échantillon suffisant pour étudier l'expression temporelle des trois gènes. En effet, cette technique n'exige que 1 µg d'ARN total ce qui permet de détourner les problèmes qu'amène un échantillonnage tissulaire restreint. La technologie « SMART » permet d'obtenir l'amplification des ADNc issue d'ARNm de manière



efficace. Elle combine en une seule étape la synthèse du premier brin d'ADNc et l'ajout de séquences d'ancrage aux extrémités 5' et 3' des ADNc simple brin. Dans la trousse l'oligonucléotide « SMART », qui consiste en une amorce présentant une extension de G en 3' se lie à la queue riche en C des ADNc servant alors d'extension matricielle pour la transcriptase inverse. Lorsque la transcriptase inverse atteint l'extrémité 5' des ARNm, l'enzyme change de matrice et continue la réplication jusqu'à l'extrémité de l'oligonucléotide « SMART ». Les molécules simples brins d'ADNc résultantes présentent l'extrémité 5' complète de l'ARNm de même que les séquences complémentaires à l'oligonucléotide « SMART ». Les séquences d'ancrages comprises sur les oligonucléotides « SMART » et poly dT modifiés (amorce CDS) servent ainsi de sites de liaisons d'amorces universelles pour l'amplification de la population entière d'ADNc (Zhumabayeva *et al.*, 2001). La trousse « SMART » permet donc de générer des ADNc de pleine longueur en quantité suffisante en gardant la complexité de la population d'ARNm originale et ce, à partir d'une faible quantité d'ARN totale initiale. Comme il est difficile d'extraire l'ARNm de la peau de cheval, ceci est un avantage significatif. C'est pourquoi, malgré les coûts élevés liés à l'achat des trousse « SMART », cette technique a été choisie pour obtenir l'amplification des ADNc issus d'ARNm. L'expression temporelle des gènes a été déterminée par RT-PCR, une technique déjà utilisée dans nos laboratoires et qui s'est révélée moins longue et moins coûteuse que le RT-PCR en temps réel tout en donnant des résultats comparables (Bedard *et al.*, 2003; Fayad *et al.*, 2004).

Nous n'avons pas trouvé de différence d'expression du gène pour PECAM1 parmi les groupes, tous temps confondus, or, le taux était plus fort dans la peau non-lésée des membres que dans celle du thorax. À l'inverse, un effet significatif du temps, tous groupes confondus, fut décelé. En effet, le taux d'expression était bas dans la peau normale, alors qu'un trauma induisait une hausse significative de l'expression dès la première semaine suivant la création de la plaie et qui persistait pour la durée de l'étude. Ces résultats concordent partiellement avec ceux notés dans un modèle de guérison cutanée chez la souris, où une induction d'expression survenait à trois jours et était maintenue jusqu'au douzième jour suivant le trauma (Galeano *et al.*, 2004). Nous nous attendions pareillement à ce que l'expression de ce gène angiogénique soit à la baisse au

moment où débiterait théoriquement la phase de remodelage, en raison de la réduction de la vascularité. Il a été rapporté précédemment que le processus de guérison chez le cheval est lent (Lepault *et al.*, 2005), ce qui favorise les plaies de nature indolente. En effet, il appert que chez cette espèce la résolution des phases de guérison soit retardée, particulièrement en ce qui a trait aux plaies appendiculaires. Le modèle expérimental de cette étude ne permet malheureusement pas de conclure à un effet causal de PECAM1; il est possible que son expression génique persistante ne soit qu'une manifestation de la durée accrue de la réponse à l'injure (figures 14 a et b).



**Figure 14. Phases de la guérison.** Patron d'expression de PECAM1 a) durée normale b) durée retardée.

Une fonction marquante de PECAM1 concerne son habileté à promouvoir la migration trans-endothéliale des leucocytes. Une semaine suivant la création de la blessure cutanée, l'expression génique de PECAM1 était significativement plus grande dans les plaies thoraciques que dans les plaies des jambes. Ceci pourrait signaler le potentiel de la peau du tronc à mieux répondre, en phase aiguë, à une injure via une réponse inflammatoire plus rapide et efficace, ce qui fut rapporté antérieurement (Wilmink *et al.*, 1999a; Wilmink *et al.*, 1999b; Wilmink *et al.*, 2002) Par ailleurs, il est tentant de postuler que la hausse significative de PECAM1 dans le groupe des jambes bandées à quatre semaines puisse être liée à la présence excessive de tissu de granulation à ce site. En effet, le développement d'un « bouton de chair » dépend, entre autres, de la persistance de cellules (et médiateurs) inflammatoires (Wilmink *et al.*,

*et al.*, 1999b; Wilmink *et al.*, 2002), d'une angiogénèse accrue, ainsi que d'une apoptose déficiente (Lepault *et al.*, 2005); PECAM1 est considéré pro-inflammatoire (Bogen *et al.*, 1994; Solowiej *et al.*, 2003), pro-angiogénique, et anti-apoptotique (Zocchi et Poggi, 2004).

Nous avons trouvé une différence significative dans l'expression génique de PI10 entre groupes, tous temps confondus. Spécifiquement, alors que le patron d'expression temporelle était le même pour le membre et le thorax, l'amplitude d'expression était moindre au thorax sur toute la période d'étude. Nous avons ciblé ce gène, membre de la famille des serpins, parce qu'une étude antérieure l'a mis en évidence durant le processus de cicatrisation cutanée chez le cheval (Lefebvre-Lavoie *et al.*, 2005). Cependant, très peu est connu à son sujet, ce qui oblige à la spéculation. Puisqu'il inhibe la mort cellulaire induite par le TNF- $\alpha$  (Schleef et Chuang, 2000), il est tentant de suggérer que cet effet anti-apoptotique pourrait nuire à la résolution des diverses phases de la guérison localisées au membre, en particulier la phase inflammatoire. Pour sa part, le patron d'expression génique du membre bandé (modèle de « bouton de chair ») est erratique, ce qui rend son interprétation difficile. Ces variations erratiques pourraient représenter un dérèglement de l'expression du à la stimulation du bouton de chair, nous montrant ainsi un patron d'expression pathologique. Cependant, il est difficile d'établir des liens entre le patron d'expression et les phases de la guérison tissulaire. Il se peut que ces variations erratiques proviennent du fait que les échantillons des quatre chevaux aient été rassemblés en un seul. En effet, une variation inter-animale importante pourrait expliquer un patron erratique.

Malgré qu'aucune différence significative entre groupes, tous temps confondus, ne fût trouvée dans l'expression génique de PEDF, cette dernière variait avec le temps de sorte qu'elle était supérieure dans les plaies thoraciques par rapport aux plaies appendiculaires, aux semaines 1, 2 et 6. On attribue à PEDF deux effets principaux, soit anti-inflammatoire et anti-angiogénique. Sa présence accrue à une et deux semaines dans les plaies thoraciques, qui chez le cheval démontrent une résolution normale de la réponse inflammatoire à une blessure cutanée (Wilmink *et al.*, 1999a; Wilmink *et al.*, 1999b), suggère que PEDF pourrait contribuer à cette rémission hâtive. Par la suite, une diminution de PEDF au thorax, comparativement à ce qui est détecté aux membres,

assureraient une bonne angiogénèse. Il est tentant de spéculer que la baisse ponctuelle d'expression de PEDF limitée à la deuxième semaine dans les plaies de jambe bandée pourrait signaler un stimulus angiogénique; PEDF représenterait ainsi un des éléments déclencheurs favorisant l'apparition du « bouton de chair » à cet endroit. Dans le cas de PEDF et de nombreux autres gènes, plus d'un rôle peuvent être assignés à sa protéine fonctionnelle. Ceci complique l'interprétation de l'expression génique et pourrait expliquer le patron décousu retrouvé dans les plaies de jambe bandée. Des analyses immunohistochimiques sont présentement en cours de réalisation afin de préciser la localisation de la protéine lors des différentes étapes de guérison dans l'espoir de mieux définir son action. Évidemment, celles-ci devront être suivies par une étude du processus de guérison chez des animaux dont le gène PEDF a été invalidé, tel que déjà fait pour d'autres gènes (Basu *et al.*, 2001).

Finalement, nous sommes maintenant à vérifier ce qu'il en est au plan protéique par des études immunohistochimiques. La caractérisation effectuée par la présente étude a servi à déterminer quels anticorps, parmi ceux commercialement disponibles, seraient compatibles avec les tissus équins et lesquels devront être produits. Cette démarche pourrait préciser la localisation de la protéine et ainsi faciliter l'interprétation des patrons d'expression selon les différentes fonctions d'un même gène. Elle permettra aussi de déterminer la relation entre les variations des taux d'expression d'ARN et les variations des taux d'expression protéique. De plus, en effectuant une étude immunohistochimique sur des échantillons à divers temps suivant le trauma nous pourrions définir la vitesse à laquelle les protéines entrent en action suite à la production de l'ARN. Par la suite, l'étude du processus de guérison chez des animaux dont les gènes d'intérêts auront été invalidés est nécessaire afin de cheminer vers des solutions thérapeutiques aux problèmes de guérison tissulaire.

## Conclusion

Dans cette étude nous avons caractérisé la séquence nucléotidique équine de *PECAM1*, *PI10* et *PEDF* ainsi qu'établi leur expression temporelle lors de la guérison cutanée chez le cheval. La caractérisation de ces gènes chez l'équin a permis de spécifier les modèles animaux se rapprochant le plus de l'espèce pour chacun des gènes. Les séquences nucléiques permettront aussi de faire le choix d'anticorps qui sont compatibles avec les tissus équins pour effectuer des études immunohistochimiques. L'analyse de l'expression temporelle indique que ces gènes ont des patrons d'expression leur étant spécifique et a permis d'élucider l'impact de ces gènes sur la guérison et vice et versa, particulièrement en ce qui a trait à l'angiogenèse. Les différents patrons d'expression des gènes selon que les plaies soient situées au thorax, au membre ou au membre bandé (simulation de guérison pathologique) nous ont suggéré quels patrons étaient souhaitables pour une meilleure guérison. Le patron d'expression de *PECAM1* nous a permis de déterminer que la période et les étapes de la guérison étaient prolongées chez le cheval. Le patron d'expression de *PEDF* a fait ressortir l'importance de sa propriété anti-inflammatoire durant la guérison tissulaire. Les différences dans l'expression de *PI10* et *PEDF* selon le lieu de la blessure nous confirment un impact de l'expression génique sur le succès de la guérison.

## **Bibliographie**

- Alberdi, E, Aymerich MS, Becerra SP. 1999. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* **274**(44): 31605-12.
- Amadeu, T, Braune A, Mandarim-de-Lacerda C, Porto LC, Desmouliere A, Costa A. 2003. Vascularization pattern in hypertrophic scars and keloids: a stereological analysis. *Pathol Res Pract* **199**(7): 469-73.
- Araki, T, Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP. 1998. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) differentially protects immature but not mature cerebellar granule cells against apoptotic cell death. *J Neurosci Res* **53**(1): 7-15.
- Aymerich, MS, Alberdi EM, Martinez A, Becerra SP. 2001. Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(13): 3287-93.
- Bartuski, AJ, Kamachi Y, Schick C, Overhauser J, Silverman GA. 1997. Cytoplasmic antiproteinase 2 (PI8) and bomapin (PI10) map to the serpin cluster at 18q21.3. *Genomics* **43**(3): 321-8.
- Basu, A, Kligman LH, Samulewicz SJ, Howe CC. 2001. Impaired wound healing in mice deficient in a matricellular protein SPARC (osteonectin, BM-40). *BMC Cell Biol* **2**: 15 Epub.
- Becerra, SP. 1997. Structure-function studies on PEDF. A noninhibitory serpin with neurotrophic activity. *Adv Exp Med Biol* **425**: 223-37.
- Becerra, SP, Palmer I, Kumar A, Steele F, Shiloach J, Notario V, Chader GJ. 1993. Overexpression of fetal human pigment epithelium-derived factor in *Escherichia coli*. A functionally active neurotrophic factor. *J Biol Chem* **268**(31): 23148-56.
- Becerra, SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V. 1995. Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop. *J Biol Chem* **270**(43): 25992-9.

- Bedard, J, Brule S, Price CA, Silversides DW, Lussier JG. 2003. Serine protease inhibitor-E2 (SERPINE2) is differentially expressed in granulosa cells of dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* **64**(2): 152-65.
- Bettinger, DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. 1996. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg* **98**(5): 827-33.
- Bilak, MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW. 1999. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(7): 719-28.
- Bogen, S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* **179**(3): 1059-64.
- Bornstein, P. 2001. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest* **107**(8): 929-34.
- Cao, G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisser HM. 2002. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(5): C1181-90.
- Cao, W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF. 1999. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* **57**(6): 789-800.
- Cao, W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF. 2001. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(7): 1646-52.
- Childress, BB, Stechmiller JK. 2002. Role of nitric oxide in wound healing. *Biol Res Nurs* **4**(1): 5-15.

- Chomczynski, P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Chuang, TL, Schleef RR. 1999. Identification of a nuclear targeting domain in the insertion between helices C and D in protease inhibitor-10. *J Biol Chem* **274**(16): 11194-8.
- Clark, R. 1993. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* **306**(1): 42-8.
- Clark, R (1996a). The role of myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. The molecular and cellular biology of wound repair, Plenum Press: p. 391-423.
- Clark, R (1996b). Transforming growth factor-B. The molecular and cellular biology of wound repair. New York, Plenum Press: p.249-273.
- Cochrane, CA, Pain R, Knottenbelt DC. 2003. In-vitro contraction in the horse: differences between body and limb wounds. *Wounds* **15**(6): 175-181.
- Costa, C, Soares R, Schmitt F. 2004. Angiogenesis: now and then. *Apmis* **112**(7-8): 402-12.
- Crawford, SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, De Vries GH, Abramson LP, Bouck N. 2001. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4421-8.
- Dasu, MR, Hawkins HK, Barrow RE, Xue H, Herndon DN. 2004. Gene expression profiles from hypertrophic scar fibroblasts before and after IL-6 stimulation. *J Pathol* **202**(4): 476-85.
- Dawson, DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* **285**(5425): 245-8.



- DeCoster, MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG. 1999. Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **56**(6): 604-10.
- DeLisser, HM, Newman PJ, Albelda SM. 1993. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). *Curr Top Microbiol Immunol* **184**: 37-45.
- Desmouliere, A, Chaponnier C, Gabbiani G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* **13**(1): 7-12.
- Desmouliere, A, Darby IA, Gabbiani G. 2003. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* **83**(12): 1689-707.
- Diegelmann, RF, Evans MC. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**: 283-9.
- DiPaolo, BR, Pignolo RJ, Cristofalo VJ. 1995. Identification of proteins differentially expressed in quiescent and proliferatively senescent fibroblast cultures. *Exp Cell Res* **220**(1): 178-85.
- Doll, JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, Cornwell ML, Pins MR, Borensztajn J, Crawford SE. 2003. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* **9**(6): 774-80.
- Duncan, GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, Luis de la Pompa J, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller WA, Senaldi G, Zukowski MM, Mak TW. 1999. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* **162**(5): 3022-30.
- Fayad, T, Levesque V, Sirois J, Silversides DW, Lussier JG. 2004. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod* **70**(2): 523-33.

- Feng, D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. 2004. Ultrastructural localization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1, CD31) in vascular endothelium. *J Histochem Cytochem* **52**(1): 87-101.
- Fitch, RB, Swaim SF. 1995. The role of epithelialization in wound healing. *The Compendium* **17**(2): 167-177.
- Francis, MK, Appel S, Meyer C, Balin SJ, Balin AK, Cristofalo VJ. 2004. Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J Invest Dermatol* **122**(5): 1096-105.
- Galeano, M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. 2004. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* **53**(9): 2509-17.
- Gao, G, Li Y, Zhang D, Gee S, Crosson C, Ma J. 2001. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* **489**(2-3): 270-6.
- Gao, HK, Zhou ZG, Han FH, Chen YQ, Yan WW, He T, Wang C, Wang Z. 2005. Differences in platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression between peripheral circulation and pancreatic microcirculation in cerulein-induced acute edematous pancreatitis. *World J Gastroenterol* **11**(5): 661-4.
- Gillitzer, R, Goebeler M. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* **69**(4): 513-21.
- Gratzinger, D, Canosa S, Engelhardt B, Madri JA. 2003. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *Faseb J* **17**(11): 1458-69.
- Haisa, M, Okochi H, Grotendorst GR. 1994. Elevated levels of PDGF alpha receptors in keloid fibroblasts contribute to an enhanced response to PDGF. *J Invest Dermatol* **103**(4): 560-3.
- Herouy, Y. 2001. Matrix metalloproteinases in skin pathology (Review). *Int J Mol Med* **7**(1): 3-12.

- Hjelmeland, LM, Cristofolo VJ, Funk W, Rakoczy E, Katz ML. 1999. Senescence of the retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **5**: 33.
- Holekamp, NM, Bouck N, Volpert O. 2002. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* **134**(2): 220-7.
- Houenou, LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, Becerra SP. 1999. Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol* **412**(3): 506-14.
- Knottenbelt, DC. 1997. Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? *Veterinary Dermatology* **8**: 273-290.
- Ladin, DA, Hou Z, Patel D, McPhail M, Olson JC, Saed GM, Fivenson DP. 1998. p53 and apoptosis alterations in keloids and keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* **6**(1): 28-37.
- Lefebvre-Lavoie, J, Lussier JG, Theoret CL. 2005. Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. *Physiol Genomics* **22**(2): 157-70.
- Legendre, M, Gautheret D. 2003. Sequence determinants in human polyadenylation site selection. *BMC Genomics* **4**(1): 7 Epub.
- Lepault, E, Celeste C, Dore M, Martineau D, Theoret CL. 2005. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen* **13**(5): 520-9.
- Levesque, V, Fayad T, Ndiaye K, Nahe Diouf M, Lussier JG. 2003. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques* **35**(1): 72-8.
- Li, J, Zhang YP, Kirsner RS. 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech* **60**(1): 107-14.

- Luo, S, Benathan M, Raffoul W, Panizzon RG, Egloff DV. 2001. Abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg* **107**(1): 87-96.
- Mahooti, S, Graesser D, Patil S, Newman P, Duncan G, Mak T, Madri JA. 2000. PECAM-1 (CD31) expression modulates bleeding time in vivo. *Am J Pathol* **157**(1): 75-81.
- Marcus, AJ. 1986. Transcellular metabolism of eicosanoids. *Prog Hemost Thromb* **8**: 127-42.
- Martin, P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR. 2003. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* **13**(13): 1122-8.
- Matsumoto, K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K. 2004. Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **40**(1): 252-9.
- Matsumura, T, Wolff K, Petzelbauer P. 1997. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol* **158**(7): 3408-16.
- McColl, BK, Stacker SA, Achen MG. 2004. Molecular regulation of the VEGF family -- inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Apmis* **112**(7-8): 463-80.
- Midwood, KS, Williams LV, Schwarzbauer JE. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(6): 1031-7.
- Neubauer, K, Ritzel A, Saile B, Ramadori G. 2000. Decrease of platelet-endothelial cell adhesion molecule 1-gene-expression in inflammatory cells and in endothelial cells in the rat liver following CCl(4)-administration and in vitro after treatment with TNFalpha. *Immunol Lett* **74**(2): 153-64.
- O'Brien, CD, Cao G, Makrigiannakis A, DeLisser HM. 2004. Role of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of PECAM-1 in PECAM-1-dependent cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(4): C1103-13.

- Ogata, N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. 2002a. Inverse levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* **133**(6): 851-2.
- Ogata, N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. 2002b. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **134**(3): 348-53.
- Ogata, N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Sakamoto T, Matsumura M. 2001a. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* **132**(3): 378-82.
- Ogata, N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M. 2001b. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* **22**(4): 245-52.
- Ohno-Matsui, K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, Hayano M, Murota SI, Mochizuki M. 2001. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* **189**(3): 323-33.
- Park, JE, Barbul A. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* **187**(5A): 11S-16S.
- Petersen, SV, Valnickova Z, Enghild JJ. 2003. Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* **374**(Pt 1): 199-206.
- Polo, M, Ko F, Busillo F, Cruse CW, Krizek TJ, Robson MC. 1997. The 1997 Moyer Award. Cytokine production in patients with hypertrophic burn scars. *J Burn Care Rehabil* **18**(6): 477-82.
- Potempa, J, Korzus E, Travis J. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **269**(23): 15957-60.

- RayChaudhury, A, Elkins M, Kozien D, Nakada MT. 2001. Regulation of PECAM-1 in endothelial cells during cell growth and migration. *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(7): 686-91.
- Ren, JG, Jie C, Talbot C. 2005. How PEDF prevents angiogenesis: a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* **64**(1): 74-8.
- Riewald, M, Chuang T, Neubauer A, Riess H, Schleef RR. 1998. Expression of bomapin, a novel human serpin, in normal/malignant hematopoiesis and in the monocytic cell lines THP-1 and AML-193. *Blood* **91**(4): 1256-62.
- Riewald, M, Schleef RR. 1995. Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specifically in the bone marrow. *J Biol Chem* **270**(45): 26754-7.
- Sambrook, J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning ; A laboratory manual* New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawant, S, Aparicio S, Tink AR, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. 2004. Regulation of factors controlling angiogenesis in liver development: a role for PEDF in the formation and maintenance of normal vasculature. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(2): 408-13.
- Sayah, DN, Soo C, Shaw WW, Watson J, Messadi D, Longaker MT, Zhang X, Ting K. 1999. Downregulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res* **87**(2): 209-16.
- Schenkel, AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* **3**(2): 143-50.
- Schimmenti, LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM. 1992. Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J Cell Physiol* **153**(2): 417-28.

- Schleef, RR, Chuang TL. 2000. Protease inhibitor 10 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced cell death. Evidence for the formation of intracellular high M(r) protease inhibitor 10-containing complexes. *J Biol Chem* **275**(34): 26385-9.
- Schmid, P, Itin P, Cherry G, Bi C, Cox DA. 1998. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* **152**(2): 485-93.
- Schultz, GS, Mast BA. 1998. Molecular analysis of the environment of healing and chronic wounds: Cytokines, proteases, and growth factors. *Wounds* **10**(F): 1F-9F.
- Seringhaus, M, Paccanaro A, Borneman A, Snyder M, Gerstein M. 2006. Predicting essential genes in fungal genomes. *Genome Res* **16**(9): 1126-35.
- Sheibani, N, Sorenson CM, Frazier WA. 1999. Tissue specific expression of alternatively spliced murine PECAM-1 isoforms. *Dev Dyn* **214**(1): 44-54.
- Shioji, G, Ezura Y, Nakajima T, Ohgaki K, Fujiwara H, Kubota Y, Ichikawa T, Inoue K, Shuin T, Habuchi T, Ogawa O, Nishimura T, Emi M. 2005. Nucleotide variations in genes encoding plasminogen activator inhibitor-2 and serine proteinase inhibitor B10 associated with prostate cancer. *J Hum Genet* **50**(10): 507-15.
- Singer, AJ, Clark RA. 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**(10): 738-46.
- Singh, VK, Chader GJ, Rodriguez IR. 1998. Structural and comparative analysis of the mouse gene for pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Mol Vis* **4**: 7.
- Solowiej, A, Biswas P, Graesser D, Madri JA. 2003. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol* **162**(3): 953-62.
- Spranger, J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M, Ristow M, Francis MK, Cristofalo V, Hammes HP, Smith G, Boulton M, Pfeiffer AF. 2001. Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* **50**(12): 2641-5.

- Sugita, Y, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP. 1997. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) has direct effects on the metabolism and proliferation of microglia and indirect effects on astrocytes. *J Neurosci Res* **49**(6): 710-8.
- Sund, M, Xie L, Kalluri R. 2004. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *Apmis* **112**(7-8): 450-62.
- Taniwaki, T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP. 1995. Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem* **64**(6): 2509-17.
- Theoret, CL. 2001. Growth factors in cutaneous wound repair. *Equine Compendium* **23**(4): 383-389.
- Theoret, CL. 2005. The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin North Am Equine Pract* **21**(1): 1-13.
- Theoret, CL, Barber SM, Moyana TN, Gordon JR. 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): 269-77.
- Thomas, DW, Hopkinson I, Harding KG, Shepherd JP. 1994. The pathogenesis of hypertrophic/keloid scarring. *Int J Oral Maxillofac Surg* **23**(4): 232-6.
- Tombran-Tink, J, Barnstable CJ. 2003. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* **4**(8): 628-36.
- Tombran-Tink, J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, Chader GJ. 1996. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis* **2**: 11.
- Tombran-Tink, J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D. 1995. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* **15**(7 Pt 1): 4992-5003.



- Tortora, GJ, Grabowski SR. 2001. Principes d'anatomie et de physiologie. Saint-Laurent, Québec, éditions du renouveau pédagogique.
- Tredget, EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. 1997. Hypertrophic scars, keloids, and contractures. The cellular and molecular basis for therapy. *Surg Clin North Am* **77**(3): 701-30.
- Tsou, R, Cole JK, Nathens AB, Isik FF, Heimbach DM, Engrav LH, Gibran NS. 2000. Analysis of hypertrophic and normal scar gene expression with cDNA microarrays. *J Burn Care Rehabil* **21**(6): 541-50.
- Tuan, TL, Nichter LS. 1998. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today* **4**(1): 19-24.
- Ulger, C, Toruner GA, Alkan M, Mohammed M, Damani S, Kang J, Galante A, Aviv H, Soteropoulos P, Tolia PP, Schwalb MN, Dermody JJ. 2003. Comprehensive genome-wide comparison of DNA and RNA level scan using microarray technology for identification of candidate cancer-related genes in the HL-60 cell line. *Cancer Genet Cytogenet* **147**(1): 28-35.
- Van den Boom, R, Wilmink JM, O'Kane S, Wood J, Ferguson MW. 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): 188-94.
- Vaporciyan, AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren, II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* **262**(5139): 1580-2.
- Vollmar, B, Schmits R, Kunz D, Menger MD. 2001. Lack of in vivo function of CD31 in vascular thrombosis. *Thromb Haemost* **85**(1): 160-4.
- Volpert, OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. 2002. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* **8**(4): 349-57.

- Wang, Y, Su X, Sorenson CM, Sheibani N. 2003. Tissue-specific distributions of alternatively spliced human PECAM-1 isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**(3): H1008-17.
- Williams, JL, Weichert A, Zakrzewicz A, Da Silva-Azevedo L, Pries AR, Baum O, Egginton S. 2006. Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis. *Clin Sci (Lond)* **110**(5): 587-95.
- Wilmink, JM, Nederbragt H, van Weeren PR, Stolk PW, Barneveld A. 2001. Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine Vet J* **33**(5): 499-505.
- Wilmink, JM, Stolk PW, van Weeren PR, Barneveld A. 1999a. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopic aspects. *Equine Vet J* **31**(1): 53-60.
- Wilmink, JM, van Herten J, van Weeren PR, 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): 270-3.
- Wilmink, JM, van Weeren PR, Stolk PW, Van Mil FN, Barneveld A. 1999b. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. *Equine Vet J* **31**(1): 61-7.
- Wilmink, JM, Veenman JN, van den Boom R, Rutten VP, Niewold TA, Broekhuisen-Davies JM, Lees R, Armstrong S, van Weeren PR, Barneveld A. 2003. Differences in polymorphonucleocyte function and local inflammatory response between horses and ponies. *Equine Vet J* **35**(6): 561-9.
- Worley, CA. 2004a. The wound healing process symphony: Part I. *Dermatol Nurs* **16**(1): 67, 72.
- Worley, CA. 2004b. The wound healing process symphony: Part II. *Dermatol Nurs* **16**(2): 179-80.
- Yager, DR, Nwomeh BC. 1999. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* **7**(6): 433-41.

- Zhang, SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX. 2006. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* **20**(2): 323-5.
- Zhou, Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM. 1999. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **3**(2): 181-8.
- Zhumabayeva, B, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD. 2001. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* **30**(1): 158-63.
- Zocchi, MR, Poggi A. 2004. PECAM-1, apoptosis and CD34+ precursors. *Leuk Lymphoma* **45**(11): 2205-13.

