



**UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
SERVICE DE PHYSIOLOGIE**

**ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE SUR DES CELLULES NUCLEES DU
SANG ET DU LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE CHEZ DES
CHEVAUX POUSSIFS**

**TRANSCRIPTOMIQUE STUDY IN NUCLEAR CELLS FROM BLOOD
AND BRONCHO-ALVEOLAR LAVAGE IN HEAVES-AFFECTED
HORSES**

Eve RAMERY

**MEMOIRE PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DEA EN SCIENCES VETERINAIRES
ORIENTATION MEDECINE VETERINAIRE**

ANNEE ACADEMIQUE 2005-2006

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur Pierre Lekeux, pour m'avoir donné l'envie, les moyens et la persévérance nécessaires à la réalisation de ce D.E.A.

Je remercie ma co-promotrice, le Dr Tania Art, qui m'a initiée à la réalisation d'un protocole expérimentale et dont l'organisation et les conseils avisés m'ont accompagnée tout au long de la réalisation de cette étude.

J'adresse tout spécialement mille mercis à Rodrigue Closset qui m'a initiée à l'univers de la biologie moléculaire, mettant à ma disposition son savoir, son habileté et aussi beaucoup de son temps.

Je remercie le Dr Audrey Fraipont, le Dr Emmanuelle Salinas et Jean-Clément Bustin pour leur collaboration dans la réalisation du protocole expérimentale, leur soutien et tous nos éclats de rire.

Je dois un merci tout particulier au Dr Emmanuelle van Erck, dont la qualité d'écoute est exceptionnelle. Ses conseils avisés m'ont beaucoup apporté, et ce à tous points de vue.

Merci aux Drs Charlotte Sandersen et Catherine Delguste ainsi qu'à Fabienne Pyr qui ont accepté de mettre leurs chevaux à ma disposition.

Je remercie le Professeur Fabrice Bureau pour ses précieux conseils scientifiques.

Merci aux Drs Renaud Clause et Benoit Hennuy pour leur contribution scientifique et pratique aux manipulations transcriptomiques.

Un grand merci également à Martine Leblond pour son aide dans l'élaboration de la bibliographie et à Ilham Sbaï pour son assistance dans mon conflit quotidien contre l'informatique.

Merci enfin à toute l'équipe de la physiologie à qui je dois quelques uns des plus jolis moments de ces dix derniers mois.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BTG1: B-cell translocation gene 1 anti-proliferative

CPD: carboxypeptidase D

CYBB: cytochrome b-245 beta polypeptide (chronic granulomatous disease)

IL: Interleukine

LBA: Lavage Broncho-alveolaire

MARCKS: myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate

ORVR: Obstruction récurrente des voies respiratoires

PCR: Polymérase Chain Réaction

RT-PCR: PCR en temps réel

PTPRC: protein tyrosine phosphatase receptor type C

PTX3: pentraxin-related gene rapidly induced by IL-1 beta

TNF-alpha: Tumor Necrosis Factor alpha

Table des matières

I. Résumé

II. Summary

III. Introduction

1. Obstruction récurrente des voies respiratoires

2. Technique du micro-damier

2. a. *Elaboration du micro-damier Affymetrix®*

2. b. *Utilisation du micro-damier*

2. c. *Exploitation des résultats*

3. Objectifs de l'étude

IV. Matériel et Méthode

1. Animaux expérimentaux et protocole

2. Score Clinique

3. Test d'oscillométrie à impulsion

4. Prélèvements et isolation des cellules

4. a. *Lavage bronchoalvéolaire*

4. b. *Isolation des cellules du lavage bronchoalvéolaire*

4. c. *Prélèvements sanguins*

4. d. *Isolation des cellules nucléées du sang*

5. Extraction des ARN totaux

6. Contrôle qualité de l'ARN total

6. a. *Sur gel d'électrophorèse*

6. b. *Sur Agilent*

7. Quantification de l'ARN total

8. Réalisation des pools

9. Hybridation sur micro-damier Affymetrix®

10. Etude par Polymérase Chain Réaction en temps réel (RT-PCR)

10. a. *Dessin et spécificité des amorces*

10. b. *Transcription inverse*

10. c. *PCR en temps réel*

11. Analyse des données

V. Résultats

- 1. Résultats des tests cliniques et biochimiques**
- 2. Résultats des micro-damiers**
- 3. Résultats de la RT-PCR**

VI. Discussion

VII. Bibliographie

I. Résumé

La pousse est une cause fréquente de maladie pulmonaire chronique chez le cheval. La compréhension de sa pathophysiologie est essentielle afin de développer des traitements plus efficaces. Vu qu'il n'existe pas actuellement de micro-damier homologue équin, l'utilité d'un micro-damier hétérologue (Affymetrix® GeneChip Human Genome Array), investiguant l'expression génomique de plusieurs milliers de gènes, a été testée dans les cellules nucléées du sang et du lavage broncho alvéolaire (LBA) de 7 chevaux sains et 7 poussifs, en crise de pousse sévère puis modérée. Malgré la forte homologie entre le génome équin et humain (>90%), les gènes essentiels de l'inflammation que sont l'IL1 β et l'IL8 n'ont pas été détectés par ce micro-damier. Une RT-PCR a pourtant permis de montrer que l'ARNm de ces gènes était bien présent dans les échantillons testés et qu'ils étaient sur-exprimés dans les cellules nucléées du LBA des chevaux poussifs. Le micro-damier hétérologue Affymetrix® humain ne représente donc pas un outil fiable pour dresser un tableau global de l'expression des gènes lors d'ORVR et l'utilisation du micro-damier comme outil d'investigation de la pathophysiologie de la pousse chez le cheval requiert l'élaboration d'un micro-damier homologue équin.

Mots-clés : pousse, micro-damier, expression génomique, cheval

II. Summary

Heaves is a common cause of chronic pulmonary disease in horses. The understanding of the the pathophysiology of this disease is essential to develop more efficient treatments. As equine homologous micro-array have not been available so far, the use of an heterologous micro-array (Affymetrix® GeneChip Human Genome Array), investigating the genomic expression of thousands of genes, has been tested in nuclear cells from blood and broncho-alveolar lavage (BAL) samples of 7 healthy and 7 heaves-affected horses in crisis. Despite the fact that up to 90% of the human and equine genomes are homologous, the expression of IL1 β and IL8, essential inflammatory genes, have not been detected by the micro-array. In contrast, an RT-PCR showed that mRNA was present for these genes and that they were over-expressed in nucleated cells from the BAL of heaves-affected horses. Consequently, the heterologous micro-array Affymetrix® does not represent a reliable tool to picture the expression of genes in heaves-affected horses and the use of the micro-array as a tool to investigate the physiopathology of recurrent airway obstruction requires the development of an homologous equine micro-array.

Keywords : heaves, micro-array, genomic expression, horse.

III. Introduction

1. L'obstruction récurrente des voies respiratoires

La pousse ou obstruction récurrente des voies respiratoires (ORVR) est une des causes les plus fréquentes de maladie pulmonaire chronique chez le cheval (Bowles et al., 2002).

Elle apparaît chez des chevaux au box nourris avec des aliments secs (Robinson et al., 2001).

La maladie se caractérise par une hyperréactivité bronchique, une neutrophilie pulmonaire et une production excessive de mucus qui ont pour effet de réduire la compliance dynamique du poumon et d'augmenter la résistance pulmonaire et les variations de pression pleurale (Ainsworth et al., 2003).

Elle survient en réponse à l'inhalation de poussières organiques incluant moisissures et endotoxines présentes dans le foin et la paille (Robinson et al., 2001; Derksen et al., 1985).

Les manifestations cliniques de la maladie vont d'une intolérance à l'effort avec toux chez les chevaux modérément atteints à une détresse respiratoire sévère chez les chevaux gravement atteints.

Alors que des avancées considérables dans la connaissance des composants organiques qui induisent la maladie ont été réalisées ces dernières années, la pathophysiologie de l'inflammation pulmonaire manifestée lors de pousse est toujours mal comprise.

L'anamnèse et la nature réversible de l'ORVR chez le cheval sont comparables à certaines formes d'asthme chez l'homme, suggérant un mécanisme immunologique commun.

Le modèle immunologique de l'asthme chez l'homme implique une réponse cellulaire T-helper 2 comme source première des cytokines interleukines (IL)-4, IL-5 et IL-13 qui sont directement liées à la réponse pathophysiologique aux allergènes inhalés (Bowles et al., 2002).

De précédents travaux concernant la production de cytokines chez des chevaux atteints d'ORVR ont étudié les différents modes d'expression des gènes dans le LBA et les cellules mononuclées du sang périphérique.

Dans un article publié en 2005, Horohov et al. ont montré, via la méthode de la *polymerase chain reaction* (PCR) quantitative, que les chevaux souffrant d'ORVR présentaient une réponse cytokin T-helper 2 modifiée, avec, notamment, une augmentation de la production d'ARN messager (ARNm) pour l'IL-4 et l'IL-13, mais pas pour l'IL-5, dans les cellules. Ils s'accordent ainsi partiellement avec les conclusions de Cordeau et al. (2003) qui notaient une surexpression de l'ARNm codant pour l'IL-4, l'Interféron γ mais aussi l'IL-5. Ils s'opposent en revanche à Ainsworth et al. qui concluaient en 2003 que le profil cytokine des cellules des voies respiratoires ne reflète pas une réponse T-helper 2 polarisée. Selon ces derniers, l'augmentation de l'interféron- γ provient d'une voie t-bet indépendante

et ce sont les chemokines provenant des cellules épithéliales ou interstitielles qui contribueraient à l'influx neutrophilique précoce.

En tout état de cause, l'inflammation peut-être considérée comme la conséquence de l'activation des gènes de l'inflammation. Ceux-ci codent pour des cytokines, des chémokines, des molécules d'adhésion, et des enzymes inflammatoires qui, ensemble, sont responsables de l'amplification de la réponse inflammatoire, du recrutement leucocytaire et de la production de médiateurs de l'inflammation (Barnes et Adcock, 1998). L'expression de ces gènes est sous le contrôle de facteurs de transcription parmi lesquels le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) joue un rôle clé (Bureau et al., 2000^a et ^b; Sandersen et al., 2001). Les mécanismes d'interaction entre les produits de ces gènes restent cependant à élucider.

En médecine humaine, l'utilisation du micro-damier chez l'individu asthmatique a permis de confirmer l'implication de certains gènes tels que NOS2A et GPX3 (Laprise et al., 2004) mais elle a aussi permis de mettre en évidence l'implication de mécanismes jusqu'alors inconnus tels que l'équilibre arginine-arginase (Zimmerman et al., 2003).

De leur côté, Hansel et al. (2005) ont tiré profit de cette technique pour montrer que le profil d'expression génomique des patients variait en fonction de la sévérité de leur atteinte.

2. Technique du micro-damier

A l'heure actuelle de nombreuses techniques sont disponibles pour détecter et quantifier les niveaux d'expression génomiques. Parmi elles, les techniques Northern Blot, Southern Blot et les différentes méthodes PCR. Cependant, la technique du micro-damier apporte l'avantage de permettre l'étude simultanée d'un très grand nombre de gènes quand ce n'est pas la totalité du génome d'une espèce considérée. Cette technique ouvre donc de nouvelles perspectives dans le domaine de la compréhension des mécanismes qui régissent la pathophysiologie des maladies. En effet, elle permet d'étudier les niveaux d'expression des gènes en parallèle, fournissant une information statique (*ie.* dans quel tissu tel gène est exprimé) ainsi qu'une information dynamique (*ie.* comment le mode d'expression d'un gène évolue par rapport aux autres) sur l'expression du gène considéré (Duggan et al., 1999).

2.a. Elaboration du micro-damier Affymetrix®

La technique du micro-damier est une technique d'hybridation, qui, au lieu de distribuer des sondes oligonucléotidiques sur un gel ou une membrane contenant des échantillons d'ADN ou d'ARN (comme c'est le cas pour les méthodes Northern, Southern Blot), immobilise les sondes sur une surface (El Amraoui et Slimani, 2004).

Le micro-damier est un damier microscopique, un support solide sur lequel sont fixés des séquences d'acide nucléique simple brin. Chaque séquence du damier est unique et spécifique d'un seul gène.

Affymetrix® utilise une méthode de fabrication « in-situ », c'est-à-dire que les sondes sont polymérisées directement sur le micro-damier. A cette fin, la firme exploite une combinaison alliant synthèse chimique et photolithographie pour synthétiser des sondes à très haute densité sur un support solide (Venkatasubba et al., 2004). Le principe de la photolithographie repose sur la protection et l'exposition à la lumière, par un jeu de masques, de zones définies du micro-damier, qui activent les empilements de bases A, T, C et G dans un ordre choisi.

Les sondes sont des oligonucléotides longs de 25 paires de bases (bp). Chaque transcrit est représenté par un « jeu de sondes » composé d'au moins 11 oligonucléotides différents, sélectionnés à partir de 8 sections différentes du même gène minimum, et générés à partir des 600 dernières bp situés à l'extrémité 3' des séquences ciblées. Le jeu de sondes consiste en paires de sondes, l'une présentant une correspondance parfaite avec le transcrit (perfect match, PM) et une autre variant pour un nucléotide ou plus (mismatch, MM) ; soit au total 22 sondes différentes utilisées afin d'être sûr que le micro-damier détecte le bon fragment d'ARN. Cette stratégie de sondes paires identifie et minimise les effets des hybridations non spécifiques ainsi que le bruit de fond. Affymetrix® estime ainsi sa technologie suffisamment précise pour détecter une molécule d'ARN spécifique au milieu de 100.000 ARNs différents présents dans un échantillon à tester (Genechip essentials, sans date).

Le système informatisé Genechip Operating Software (GCOS) est ensuite utilisé pour traduire les intensités enregistrées pour chaque paire de sonde en une valeur numérique qui mesure l'expression (GIGA Transcriptomics Facility, sans date). Les données sont ensuite exploitées après modélisation mathématique par des systèmes algorithmiques. Le signal fluorescent, émis par les micro-damiers, permet de déterminer l'abondance relative en ARNm des échantillons testés en se basant sur une comparaison directe entre l'état des cellules de l'échantillon 'test' (les chevaux pousifs) et celui des cellules de l'échantillon de 'référence' (les chevaux sains).

2.b. Utilisation du micro-damier

Les séquences nucléotidiques que l'on souhaite étudier sont extraites à partir d'échantillons biologiques (cellules du LBA et leucocytes sanguins dans notre étude).

Le pool d'ARN messager initial est rétro-transcrit en un pool d'ADN complémentaire (ADNc). La synthèse de la cible Affymetrix® commence avec la synthèse d'ADNc double brin en présence d'un oligonucléotide poly (dT) lié à une séquence promotrice T7. L'ADNc subit alors une transcription « in vitro » en ARN complémentaire (ARNc) en présence d'une ARN polymérase T7 et de ribonucléotides modifiés, permettant l'incorporation de molécules de biotine qui permettront à leur tour l'adhésion des molécules fluorescentes.

Elles sont ensuite marquées et déposées sur le micro-damier. L'hybridation permet l'appariement spécifique des bases complémentaires de la sonde et de la cible (structure présente dans l'échantillon à tester). Les étapes de lavage permettent d'éliminer les séquences de l'échantillon qui n'ont pas apparié. Le damier est alors scanné et une image informatique est acquise. La position de la sonde complémentaire illuminée sur l'unité d'hybridation permet de déduire l'identité de l'acide nucléique hybridé. (Thomas et al., 2005).

Une fois les résultats obtenus, ceux-ci doivent être validés. La validation des résultats se fait en trois phases (Chuaqui et al., 2002) :

- contrôle expérimental de la qualité de chaque étape. Celui-ci revient à la firme.
- confirmation indépendante des données. Elle consiste à vérifier les taux d'expression des gènes trouvés dans l'expérience avec des méthodes autres que les micro-damiers. La PCR en temps réel est la technique de choix à cette fin (Nadon et Shoemaker, 2002).
- assurance de l'universalité des résultats. Elle revient à déterminer si les données obtenues sont des éléments essentiels pour la description de l'état biologique étudié.

2.c. Exploitation des résultats

Le profil d'expression est l'étude de la réponse des multiples ARNm (sous forme de concentration résultant de l'expression de leurs gènes correspondants), présents dans un type cellulaire spécifique ou un tissu, à des conditions ou traitements spécifiques. Les éventuelles sur ou sous-expressions géniques peuvent ensuite être mises en relation avec un état pathologique ou constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Les micro-damiers, qui permettent d'étudier simultanément l'expression de milliers de gènes, offrent une vision globale de l'expression des gènes dans une cellule, ce qui est souvent essentiel pour une compréhension globale de sa fonction. Les micro-damiers ont ainsi une fonction exploratoire à jouer. Ils permettent en effet d'établir de nouvelles directions pour des recherches futures et peuvent être à l'origine de nouvelles hypothèses de travail.

Grâce aux progrès de la bioinformatique, le génome de plusieurs mammifères domestiques est maintenant disponible (eg. bovin, chien, chat). L'élucidation du génome équin est en cours (Horse Genome, sans date) mais les avancées sont lentes et seul un petit nombre de gènes a jusqu'ici été cloné.

Des études précédemment menées en médecine vétérinaire avec des micro-damiers conçus sur base du génome humain et initialement destinés à la médecine humaine, ont montré qu'il était possible d'utiliser ce genre de matériel en médecine vétérinaire avec une fiabilité acceptable (Tsoi et al., 2003; Sanots et al., 2003). De plus, on considère à environ 90% l'homologie entre génome humain et équin.

3. Objectifs de l'étude

En l'absence de disponibilité d'un micro-damier homologue équin, cette étude avait pour but d'évaluer si l'utilisation d'un micro-damier hétérologue humain peut se révéler utile pour progresser dans la compréhension de la pathophysiologie de la pousse.

IV. Matériels et Méthodes

1. Animaux expérimentaux et protocole

Quatorze chevaux adultes (âge 4-23 ans, poids 330-640 kg) ont été étudiés. Sept étaient atteints de pousse (âge: 15.4 $\pm$ 4.1 ans) et avaient précédemment présenté des signes d'obstruction réversible des voies respiratoires lorsqu'exposés à du foin de mauvaise qualité. Les chevaux contrôles (n=7 ; âge 11.1 $\pm$ 6.5 ans) n'avaient pas d'historique ou de signes cliniques de pousse et ne développaient pas de signes d'allergie en réponse à l'exposition au foin de mauvaise qualité.

Tous les chevaux ont été laissés en pâture pendant les 6 mois précédant le début de l'expérience. Ils étaient vaccinés et régulièrement vermifugés. Ils ont été hébergés dans la même écurie pour toute la durée des expériences. Ils étaient nourris deux fois par jour à base de foin et de grain et étaient logés sur paille. Du foin de mauvaise qualité a été secoué dans les box 2 fois par jour pendant la semaine précédant le protocole ainsi que pendant la durée de l'expérience.

Les chevaux atteints de pousse ont été échantillonnés, après l'apparition des signes cliniques, lors d'une crise de pousse sévère, et, au terme d'une période de un mois dans un milieu dépoussiéré (copeaux et ensilage), en crise de pousse modérée. Les chevaux «contrôles» ont été échantillonnés simultanément aux chevaux en crise de pousse sévère.

Tous les chevaux ont été l'objet d'un examen général complet quotidien.

Les tests de fonction pulmonaire ainsi que les LBA ont été réalisés dans un local conçu à cet effet. Les chevaux y étaient amenés deux par deux pour réduire leur stress. Une prise de sang veineux était réalisée à ce moment par ponction jugulaire. Une prise de sang artériel était réalisée au préalable au box par ponction carotidienne à l'aide d'une aiguille (7cm de long, 20G) rattachée à une seringue héparinée de 2mL. La mesure des paramètres artériels était réalisée immédiatement grâce à un analyseur de gaz sanguins auto-calibré (OPTI CCA, Osmetech, USA). L'analyseur a été calibré par des gaz standards et des tampons. Les données étaient corrigées pour la température rectale, mesurée au moment de l'échantillonnage sanguin.

Le protocole expérimental et les manipulations subies par les chevaux ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Liège (n°d'agrément : 491).

2. Score Clinique

La méthode de détermination du score clinique décrite par Rush *et al.* (1998) a été utilisée. La dilatation des naseaux ainsi que les mouvements abdominaux étaient gradés de 1 à 4.

Pour la dilatation des naseaux les scores étaient : 1 = pas de dilatation ; 2 = dilatation légère et occasionnelle des narines ; 3 = dilatation modérée des narines ; et 4 = dilatation maximale et continue à chaque cycle respiratoire.

Pour la composante respiratoire abdominale, les grades étaient : 1 = pas de composante abdominale à la respiration ; 2 = léger mouvement abdominal ; 3 = mouvement abdominal modéré ; 4 = mouvement abdominal marqué et sévère. Ces deux scores étaient additionnés pour donner le score clinique total de telle sorte qu'un grade 2 = pas de signes, 3 ou 4 = signes intermédiaires, 5 ou 6 = signes modérés, et 7 ou 8 = signes sévères.

Les scores cliniques étaient déterminés immédiatement avant la mise en place du masque facial pour la réalisation de la mesure de la fonction pulmonaire.

3. Test d'oscillométrie à impulsion

La fonction pulmonaire a été évaluée par la méthode d'oscillométrie par impulsions, validée pour le cheval (Van Erck et al, 2003 et 2004), grâce à un IOS MasterScreen (E.Jaeger GmbH, Würzburg, Allemagne). Ce test représente une méthode non invasive d'évaluation de la fonction pulmonaire.

L'oscillométrie est l'étude de la fonction mécanique pulmonaire par l'application de forces externes au système respiratoire. Une source d'énergie externe, ici un haut-parleur, est utilisée pour envoyer dans le système respiratoire des impulsions dans une gamme de fréquences continues comprises entre 0 et 100 Hz. Celles-ci sont dirigées, via un masque facial, dans le système respiratoire. La réponse du système respiratoire à ces impulsions est mesurée sous forme de signaux de débit et de pression. Ces derniers, mesurés dans le temps, sont convertis dans le domaine fréquentiel, grâce à une transformation de Fourier, afin d'obtenir l'impédance du système respiratoire dans une gamme de fréquences de 5 à 35 Hz. L'impédance peut être divisée en deux composantes: la résistance qui caractérise la perméabilité des voies aériennes au flux d'air, et la réactance, qui reflète les propriétés élastiques du système respiratoire ainsi que l'homogénéité de la ventilation. Les mesures de résistance et de réactance à 5 et 10 Hz ont été privilégiées car ce sont les plus sensibles pour mesurer les altérations de la mécanique ventilatoire dans les voies respiratoires profondes (Van Erck et al., 2003). Avant chaque utilisation, le système a été calibré à l'aide d'une pompe de 2L (Medisoft, Dinant, Belgique) reliée au pneumotachographe.

4. Prélèvements et isolation des cellules

4.a. Lavage bronchoalvéolaire

Les chevaux ont été tranquilisés à l'aide de 0,01mg/kg de romifidine (Sedivet®) et, pour les chevaux poussifs uniquement, de butorphanol (Torbugesic®) (à la dose de 0,005mg/kg). Après la mise en place

d'un tord-nez, un fibroscope de 260 cm de long et 9 mm de diamètre (Pentax, Pays-Bas) a été introduit dans une narine, dirigé dans la trachée puis descendu dans le poumon jusqu'à ce que l'extrémité du fibroscope soit bloquée dans les voies respiratoires distales. Six seringues de 60 mL de solution saline isotonique stérile et préchauffée (37°C) ont alors été séquentiellement infusées via le canal à biopsie de l'endoscope. Immédiatement après l'infusion, le liquide de LBA était collecté dans les mêmes seringues et transféré dans une flasque stérile. Un score de sécrétions trachéales était attribué à chaque cheval sur base de l'observation visuelle au passage de l'endoscope (Gerber, 2004).

La quantité ainsi que l'aspect macroscopique du LBA étaient répertoriés et un comptage de la population cellulaire totale réalisé à l'aide d'une cellule de Thoma (Marienfeld, Allemagne). Cent cinquante microlitres étaient prélevés pour réaliser le comptage cellulaire différentiel sur plus de 200 cellules après étalement au cytopspin (SHANDON, Pittsburg, USA) à 800 rotations par minute (rpm) pendant 15 min et coloration de May-Grünwald Giemsa.

4.b. Isolation des cellules du lavage bronchoalvéolaire

Chaque prélèvement de LBA a été aliquoté dans des flacons 50 ml et centrifugé (Jouan CR312, France) à 1400 rpm pendant 20 min. Deux aliquots de 2,5 cl de surnageant ont été congelés pour d'éventuelles mesures complémentaires ultérieures. Le reste du surnageant a été écarté et le culot de cellules resuspendu dans 1 ml de PBS contenant 50 µl de protéinase K 600 U/ml (Roche, Mannheim, Allemagne) pour être ensuite transféré dans un Eppendorf 1,5 ml. Chaque Eppendorf a été centrifugé (5415C Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 7 min à 3000 rpm. Le surnageant a été décanté et le culot récupéré pour l'extraction des ARN totaux.

4.c. Prélèvements sanguins

Trois échantillons par cheval ont été prélevés sur tubes EDTA 9 ml (Vacuette Greiner bio-one, Kremsmuentenster, Autriche).

4.d. Isolation des leucocytes du sang

Une hémolyse de 10 min (solution d'hémolyse: NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 0,01 M, EDTA 0,1 mM) a été réalisée sur chaque échantillon en diluant le sang d'un rapport 4 dans un flacon de 50 ml. Après une incubation de 5 min à température ambiante, les flacons ont été centrifugés (Jouan CR312, France) pendant 20 min à 1400 rpm. Le surnageant a été écarté, le culot de leucocytes resuspendu dans 1 ml de solution d'hémolyse et transféré dans 2 Eppendorfs 1,5 ml. Ceux-ci ont été centrifugés (5415C Eppendorf, Hambourg, Allemagne) pendant 7 min à 3000 rpm. Le surnageant a été écarté et le culot récupéré pour l'extraction des ARN totaux.

5. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits des cellules isolées du LBA et du sang à l'aide du kit Qiagene RNeasy en suivant le protocole fourni avec le kit. Le volume d'élution était de 30 µl d'eau ultra pure 'RNase free' fournie avec le kit.

6. Contrôle qualité de l'ARN total

6.a. Sur gel d'électrophorèse

Trois microlitres (µL) des ARN totaux extraits par échantillon ont été déposés sur gel d'électrophorèse 1%, contenant 4 µl de bromure d'éthidium, dans du tampon TBE. Après 15 min de migration à 120 V, le gel est révélé sous UV. La qualité de l'ARN est estimée en fonction de l'intégrité des bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S.

6.b. Sur Agilent

Deux microlitres des ARN totaux extraits par échantillon ont été contrôlés avec le Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent) en suivant les instructions fournies avec l'appareil. Celui-ci donne le rapport entre le pic des rRNA 28S et 18S ainsi que le RNA Integrity Number (RIN). Des valeurs de RIN > 7 ont été considérées comme acceptables. La majorité des ARN extraits avaient un RIN de 8,5 sur l'échelle de 10.

7. Quantification de l'ARN total

Le gel d'électrophorèse donnait une estimation relative de la quantité d'ARN total en fonction de l'intensité des bandes 28S et 18S.

L'ARN total a été précisément quantifié en µg/µl à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (Isogen Life Science B. V., Belgique).

8. Réalisation des pools

Cinq pools ont été réalisés :

- ARN extrait des leucocytes du sang des chevaux sains
- ARN extrait des leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse modérée
- ARN extrait des leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse sévère

- ARN extrait des cellules du LBA des chevaux sains
- ARN extrait des cellules du LBA des chevaux en crise de pousse sévère

Chaque pool devait contenir 5 µg d'ARN dans un volume de 8 µL, soit une concentration de 0,625µg/µL.

Les échantillons dont la concentration était trop faible ont été reconcentrés au SpeedVac (LabSystems BV, Bruxelles, Belgique) puis à nouveau testés au spectrophotomètre.

La concentration de chaque échantillon était alors ajustée à l'aide d'eau ultra pure 'RNAse free' (Gibco™, Invitrogen, Paisley, Ecosse) afin de contribuer pour part égale au pool et d'atteindre au final les 5 µg d'ARN dans 8 µL.

9. Hybridation sur micro-damier Affymetrix®

Les étapes ultérieures de la réalisation des micro-damiers se sont effectuées sur une plateforme Affymetrix® (GIGA Transcriptomics Facility, Liege, Belgique). Le principe de fonctionnement a été décrit dans le chapitre introduction. Les micro-damiers utilisés étaient de type GeneChip Human Genome U133A 2.0 Array. Ces puces analysent le niveau d'expression de 18400 transcrits et variants, incluant 14500 gènes humains bien caractérisés et comprennent plus de 22000 jeux de sondes.

10. Etude par Polymerase Chain Réaction en temps réel (RT-PCR)

L'étude de l'expression des gènes par RT-PCR impliquait l'ARN total isolé des échantillons utilisés pour les micro-damiers. Chaque RT-PCR a été réalisée deux fois et chaque fois en duplicate.

10.a. Dessin et spécificité des amorces

Un alignement du transcriptome humain (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/RNA) sur une banque d'ADNc équins (Vandenplas *et al*, en ligne) a été réalisé au moyen du logiciel Blast installé en local (Zhang *et al*, 1997). Parmi les 13811 EST (expressed sequence tags) équines, 5174 ont pu être nommées avec une valeur de prédiction supérieure à 1E-12. Les amorces pour les PCR en temps réel ont été dessinées sur les séquences équines dans la région 3' de l'ADNc. Pour les séquences nucléotidiques équines non encore connues, les amorces ont été dessinées sur base des alignements des séquences ADNc entre l'humain, le porc et le bovin (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Les logiciels Oligo 6 (<http://www.oligo.net>) et Amplify (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>) ont été utilisés pour le dessin des amorces. Chaque amplicon avait une taille comprise entre 105 et 127 nucléotides (Tableau I). La spécificité de chaque couple d'amorces a été vérifiée par PCR sur de l'ADNc de leucocytes équins isolés d'un échantillon sanguin traité au TNF alpha humain. Le produit de chaque

PCR a été déposé sur gel d'électrophorèse 1% en présence de bromure d'éthidium et a migré pendant 20 min. à 120 V. Le gel a été révélé sous UV.

10.b. Transcription inverse

Une transcription inverse a été réalisée sur les pools ayant servi pour l'hybridation sur le micro damier. Le mix comprenait 1 µg d'ARN total, le tampon 5X, l'enzyme 10 U (Transcriptor Reverse Transcriptase, Roche, Allemagne), les dNTP 1 mM (Applied Biosystems, Etats Unis d'Amérique), l'oligo-dT 5 µM, les hexamers 0,08 A₂₆₀ unités (First Strand cDNA Synthesis, Roche, Allemagne) et l'eau ultra-pure requise pour amener le volume de réaction à 25 µl.

10.c. PCR en temps réel

Les PCR en temps réel ont été réalisées avec du Sybr Green (IQ Sybr Green Supermix, Bio Rad, Etats Unis d'Amérique) sur thermocycler pour PCR en temps réel (iCycler iQ real-time PCR detection system, Bio-Rad, Etats Unis d'Amérique). Le mix comprenait le supermix Sybr green 2X, les 25 µl d'ADNc précédemment réalisés et le volume d'eau requis pour amener chaque volume de réaction PCR à 20 µl. Les amorces ont été déposées dans les puits en duplicats de manière à obtenir deux courbes d'amplification pour chaque gène étudié et chaque RT-PCR a été répétée deux fois. Une courbe de dénaturation a été réalisée sur chaque produit PCR en fin de programme (Tableau II).

11. Analyse des données

Les résultats des micro-damiers ont été extraits grâce au software MAS5 et filtrés pour exclure les gènes qui n'étaient pas exprimés dans tous les échantillons. Pour identifier les différences dans l'expression des gènes entre groupes, nous avons réalisé des comparaisons paires des résultats des micro-damiers obtenus à partir des cellules nucléées du LBA des chevaux en crise de pousse sévère et des chevaux sains, des leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère et des chevaux sains, des leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère et modérée, des leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse modérée et des chevaux sains.

Les résultats des PCR en temps réel ont été analysés au moyen du logiciel fourni avec le thermocycler (iCycler software version 3.0A, Bio-Rad, USA).

Le modèle décrit par Pfaffl (2001) a été utilisé pour établir une quantification relative de l'ARNm des gènes étudiés par RT-PCR dans les échantillons. L'utilisation du gène invariant GAPDH comme standard endogène a été décidée sur base de cet article et de celui publié par Vandesompele et al. (2002). L'erreur standard a été calculée à partir des duplicats réalisés pour chaque RT-PCR.

V. Résultats

1. Résultats des tests cliniques et biochimiques

L'ensemble des résultats des tests cliniques et biochimiques sont compilés dans le tableau III. En résumé, les chevaux en crise de pousse sévère présentaient des résultats caractéristiques. En particulier, leur score clinique était très élevé (6.71 ± 0.929), leur pression partielle en oxygène artériel très basse ($73,1 \pm 11,5$ mmHg) et celle en dioxyde de carbone élevée (58.4 ± 9.58 mmHg) ; les neutrophiles étaient supérieurs à 20% dans le LBA et les valeurs de l'IOS étaient augmentées pour la résistance et diminuées pour l'impédance. Les chevaux sains présentaient des valeurs correspondant aux normes physiologiques.

Pour les chevaux en crise de pousse modérée, seul le sang veineux a été prélevé, raison pour laquelle il n'y a pas de données pour l'endoscopie et les comptages de cellules du LBA. Leurs résultats étaient intermédiaires par rapport aux sains et aux chevaux en crise de pousse sévère.

Les paramètres ne présentant pas de lien avec une atteinte de type allergique des voies respiratoires, tels que la formule sanguine ou la température, sont restés dans les normes physiologiques pour les trois catégories de chevaux.

2. Résultats des micro-damiers

Sur les 22278 sondes testées sur le micro-damier, 4256 séquences ont été détectées comme présentes dans les leucocytes sanguins des chevaux sains, 4050 dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse modérée, 3668 dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère, 4.276 dans les cellules du LBA des chevaux sains et 4168 dans les cellules du LBA des chevaux en crise de pousse sévère. Il en résulte qu'environ 20% des sondes du micro-damier ont hybridé dans les échantillons investigués.

Parmi ces séquences, 46 gènes candidats montrant des différences significatives dans leur expression (ie présentant une variation supérieure ou égale à un facteur $\log_2$ soit 4) chez le cheval en crise de pousse sévère comparé au cheval sain ont été identifiés. Parmi ceux-ci, 3 étaient sur-exprimés dans les cellules du LBA des chevaux en crise de pousse sévère en comparaison des chevaux sains (tableau IV), 10 étaient sous-exprimés dans les cellules du LBA des chevaux en crise de pousse sévère en comparaison des chevaux sains (tableau V), 31 étaient sous-exprimés dans les leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains (tableau VI), 11 étaient sous-exprimés dans les leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse sévère par rapport à ceux des chevaux en crise de pousse modérée (tableau VII) et 3 étaient sous-exprimés dans les leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse modérée comparativement à ceux des chevaux sains (tableau

VIII). A l'exception du 'B-cell translocation gene 1 'anti-proliférative'(BTG1), tous les gènes sous-exprimés dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise sévère par rapport aux chevaux en crise modérée étaient également sous-exprimés dans les leucocytes des chevaux en crise sévère par rapport aux chevaux sains, à savoir 'splicing factor 3b 'subunit 1' (SF3B1), 'ubiquitin specific peptidase 33' (USP33), 'phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein' (PICALM), 'chromosome 14 open reading frame 92' (C14orf92), 'signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)'(STAT3), 'adducin 3 (gamma)' (ADD3), 'muscleblind-like (Drosophila)' (MBNL1), 'fragile X mental retardation 'autosomal homolog 1' (FXR1), 'forkhead box O3A' (FOXO3A). Le niveau d'expression de ces gènes dans les leucocytes des chevaux en crise modérée était intermédiaire comparativement aux chevaux en crise sévère et aux chevaux sains (tableaux VI et VII). Les gènes qui étaient sous-exprimés dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise modérée par rapport aux chevaux sains (voir tableaux VI, VII et VIII) ne présentaient pas de variation d'expression dans les leucocytes sanguins des autres catégories de chevaux, à savoir entre chevaux en crise sévère et chevaux sains et entre chevaux en crise sévère et modérée. Enfin, les gènes CUG triplet repeat 'RNA binding protein 2' (CUGPB2), STAT3, 'RAP2A 'member of RAS oncogene family' (RAP2B) et 'zinc finger protein 148 (pHZ-52)' (ZNF148) étaient sous-exprimés à la fois dans les cellules nucléées du LBA et dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains, et ce dans des rapports similaires (tableaux V et VI).

3. Résultats de la RT-PCR

Ont été mesurées par RT-PCR dans les cellules du LBA et dans les leucocytes du sang des chevaux en crise de pousse sévère et des chevaux sains :

- l'expression des gènes "pentraxin-related gene rapidly induced by IL-1 β " (PTX3), "myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate" (MARCKS), "cytochrome b-245 beta polypeptide (chronic granulomatous disease)" (CYBB), "carboxypeptidase D" (CPD), BTG1, "protein tyrosine phosphatase receptor type" (PTPRC), choisis, d'une part, sur base de leurs variations d'expression détectées par les micro-damiers, et, d'autre part, pour leur intérêt potentiel dans la compréhension de la physiologie de la pousse,
- l'expression des gènes IL1 β , IL8 et TNF α , dont l'ARNm n'a pas été détecté par les micro-damiers,
- l'expression de trois gènes invariants servant de référence (GAPD, YWHAZ et TUBB).

Une courbe de dénaturation établie en même temps que la RT-PCR, a permis de vérifier la spécificité des amorces pour chaque gène. Celle-ci était excellente à l'exception du TNF α . Les résultats obtenus pour ce gène ont donc été écartés de l'interprétation.

La RT-PCR a permis de détecter dans les cellules nucléées du LBA et dans les leucocytes du sang des chevaux sains et en crise de pousse sévère la présence de PTX3, MARCKS, CYBB, CPD, BTG1 et PTPRC, de l'IL1 β et de l'IL8, ainsi que des gènes invariants.

Alors qu'IL1 β et IL18 n'avaient pas été détectés par le micro-damier, la RT-PCR a montré une sur-expression de ces gènes dans les cellules nucléées du LBA. PTX3 était surexprimé dans les cellules nucléées du LBA, de même que dans le micro-damier. MARCKS ne présentait pas de variation d'expression significative, à la différence du micro-damier, et CYBB et PTPRC étaient sous-exprimés, ce qui n'avait pas été détecté par le micro-damier. BTG1 ne variait pas significativement (figure 1).

Dans les leucocytes sanguins, CYBB, PTPRC et BTG1 étaient sous-exprimés, de même que dans le micro-damier. MARCKS était sous-exprimé, ce que le micro-damier n'avait pas détecté. PTX3, IL1 β et IL8 ne variaient pas significativement (figure 2).

VI. Discussion

Au moment d'amorcer cette discussion, un élément de modération dans l'interprétation mérite d'être mis en avant. Si la formule sanguine varie peu en fonction des différents états cliniques des chevaux, ie. sains, poussifs en crise sévère et poussifs en crise modérée, les populations cellulaires du LBA montrent des variations substantielles selon les différentes populations de chevaux. En particulier, les chevaux poussifs présentent une neutrophilie marquée dans le LBA, ce qui n'est pas le cas chez les chevaux sains.

Le fait d'étudier la population cellulaire globale au niveau du LBA a cependant été décidé en connaissance de cause, le but recherché étant d'observer le tableau d'expression global au site d'inflammation, c'est-à-dire dans le poumon, ainsi qu'au niveau systémique, dans le sang, chez des individus sains et poussifs, en crise sévère et modérée

Malgré la forte homologie entre le génome équin et humain (>90%), l'expression de certains gènes, prouvés comme essentiels dans la cascade de l'inflammation, n'a pu être démontrée par le micro-damier hétérologue humain d'Affymetrix® (ie, les gènes codant pour l'IL1 et l'IL8). On peut supposer qu'un micro-damier homologue équin aurait été en mesure de détecter ces gènes pour lesquels l'implication dans les phénomènes de pousse a par ailleurs été démontrée (Bureau et al., 2000^b, Giguere et al., 2002). En dehors de ces 2 gènes, il est possible que le micro-damier hétérologue ait ignoré d'autres gènes clés dans la pathophysiologie de la pousse. Il est dès lors difficile d'évaluer l'importance réelle des gènes mis en évidence par le micro-damier humain dans le tableau global de la maladie de la pousse, tant au niveau local, pulmonaire, qu'au niveau systémique, sanguin.

Quelques gènes, semblant présenter un intérêt d'après la littérature, ont cependant montré des différences d'expression allant jusqu'à un facteur 16 (3,9 log2) d'après le micro-damier Affymetrix®.

L'expression de certains gènes (SF3B1, USP33, PICALM, C14orf92, SF3B1, STAT3, ADD3, MBNL1, FXR1, FOXO3) a varié graduellement dans les leucocytes sanguins des chevaux sains, en crise de pousse modérée et en crise sévère, ce qui pourrait suggérer un lien entre l'expression des gènes et la sévérité de la maladie.

Par ailleurs, le fait que quelques gènes (CUGPB2, STAT3, RAP2B et ZNF148) soient sous-exprimés dans des rapports similaires dans les cellules nucléées du LBA et dans les leucocytes sanguins, chez les chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains, (voir tableaux V et VI), adresse l'hypothèse d'une implication systémique de la maladie.

Certaines variations d'expression détectées par RT-PCR ne l'avaient pas été par les micro-damiers. Une explication possible est que la RT-PCR est plus sensible et permet de détecter des concentrations plus faibles d'ARNm.

Le reste des résultats de la RT-PCR étaient bien corrélés à ceux du micro-damier.

Les gènes qui semblaient les plus pertinents d'après la littérature et leur variation d'expression sont discutés ci-dessous, à titre d'exemple.

1. PTX3

Le rôle de PTX3 a déjà été étudié chez la souris, le rat et l'homme dans des réactions inflammatoires impliquant le poumon (Garlanda et al., 2002, Soares et al., 2006). PTX3 est sur-exprimé au cours de la phase aiguë de l'inflammation et contrôle la production d'acide nitrique et de TNF-alpha (Dias et al., 2001, Soares et al., 2005). Il est produit par les macrophages et d'autres types cellulaires et tissus stimulés par des médiateurs primaires de l'inflammation tels que le lipopolysaccharide (LPS), l'IL1 ou le TNF-alpha (Brevorio et al., 1992, Lee et al., 1994). Il se lie aux cellules apoptotiques et reste associé à leur membrane de manière stable (Baruah et al., 2006). Lorsqu'il est immobilisé, PTX3 se lie à C1q (premier maillon de la voie classique d'activation du complément) et active la cascade du complément (Botazzi et al., 1997, Nauta et al., 2003). C1q et PTX3 sont produits par les cellules du système immunitaire que sont les macrophages et les cellules dendritiques (CD) (Doni et al., 2003, Castellano et al., 2004) en réponse à des composants microbiens comme le LPS (Doni et al., 2003) et à des stimuli pro-inflammatoires comme le TNF alpha. Ils sont présents aux sites d'inflammation et de nécrose tissulaire (Baruah et al., 2006).

Par ailleurs, lorsque PTX3 et C1q sont présents simultanément dans le même microenvironnement, PTX3 peut séquestrer le C1q soluble présent dans le milieu des CD et inhiber l'activation du complément sur les cellules apoptotiques, leur phagocytose par les CD en cours de maturation ainsi que la présentation croisée d'antigènes du 'soi' (Baruah et al., 2006). Il jouerait donc aussi un rôle dans la prévention des réactions auto-immunes.

Il a également la propriété de se lier à certains microorganismes déterminés tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* (Garlanda et al., 2002). Ainsi, *in vitro*, la présence de conidies d'*Aspergillus fumigatus* provoque l'activation rapide (endéans l'heure) de la production de PTX3 dans les cellules dendritiques et les phagocytes mononucléés murins et humains et, *in vivo*, l'infection par *Aspergillus fumigatus* cause, chez l'homme comme chez la souris, l'induction de PTX3 à la fois dans le LBA et dans le plasma (Garlanda et al., 2002). Chez le cheval, l'induction de PTX3 pourrait se produire, de façon similaire,

suite au contact avec les poussières organiques et particulièrement les conidies de *Microsporum Faeni*, ce qui expliquerait sa surexpression marquée dans le LBA des chevaux en crise de pousse sévère observée dans notre étude. Garlanda et al. (2002) ont également montré que la capacité des macrophages alvéolaires à ingérer et à tuer les conidies était profondément altérée chez les souris déficientes en PTX3 (par recombinaison homologue) mais que cette activité pouvait être restaurée par l'administration combinée, par voie systémique et locale, de PTX3. Ils ont également montré que PTX3 pouvait médier la résistance à *Aspergillus fumigatus* indépendamment de C1q, jouant un rôle non redondant dans la réponse immunitaire naturelle antifongique. Dans ce modèle, la régulation de l'expression de PTX3 dans les macrophages et les CD a permis de suggérer qu'il représentait un mécanisme d'amplification de la résistance naturelle aux pathogènes agissant principalement localement aux sites d'infection ou d'inflammation. La surexpression de PTX3 aurait donc principalement un rôle favorable dans les mécanismes de défense des voies respiratoires face aux micro-organismes. Cependant, dans un modèle d'inflammation pulmonaire médiée par une infection à *Klebsiella pneumoniae*, Soares et al. (2006) ont montré que si une surexpression de PTX3 chez des souris transgéniques, possédant 2 copies supplémentaires du gène murin PTX3 sous contrôle de leur propre promoteur, entraînait une meilleure réponse immunitaire que chez les souris sauvages face à un challenge aigu modéré (infection avec 3×10^4 unité formant colonies-UFC), cette surexpression devenait nettement délétère lorsque les souris étaient soumises à un challenge sévère (3×10^6 UFC), mettant en avant qu'une réponse inflammatoire exagérée peut causer des dommages tissulaires marqués, un choc hémodynamique et même la mort.

Il est possible que PTX3 joue un rôle non négligeable dans la pathogénie de la pousse chez le cheval, constituant une piste thérapeutique intéressante. D'autres investigations sont cependant nécessaires pour confirmer l'implication de ce gène dans cette maladie.

2. CYBB

CYBB encore nommé gp91phox a été étudié afin de déterminer le rôle de la NADPH oxydase dans le mécanisme de séquestration des neutrophiles dans le poumon de la souris (Gao et al., 2005). Suite à une injection intra-péritonéale d'E.coli destinée à induire une infection, les souris gp91phox^{-/-} et p47phox^{-/-} présentaient une migration transalvéolaire de neutrophiles augmentées d'environ 50% en comparaison du modèle souris sauvages. Les souris knock-out étaient, par ailleurs, incapables d'augmenter la perméabilité microvasculaire du poumon en dépit de la séquestration des neutrophiles. Même si, dans ce modèle, l'inflammation du poumon est liée à un phénomène infectieux, ce qui n'est le cas chez le cheval en crise de pousse sévère que lors de contaminations secondaires, le rôle de CYBB dans la séquestration des neutrophiles chez le cheval en crise de pousse sévère mérite d'être plus amplement étudié.

3. MARCKS

Sur base des résultats issus du micro-damier, MARCKS était fortement sous-exprimé dans les cellules nucléées du LBA des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains (rapport de 1/16). Ces résultats n'ont pas été confirmés par la RT-PCR. Ceci pourrait être lié, entre autres, à une dégradation de l'ARNm entre les 2 manipulations ou à un manque d'efficacité du primer. Ce gène présente cependant un intérêt dans la compréhension de la physiopathologie de l'asthme chez l'homme et son implication mérite d'être plus approfondie chez le cheval.

En effet, MARCKS est un inhibiteur de l'exocytose des mucines (Rogers, 2002). Les mucines confèrent au mucus la viscosité adéquate pour le transport mucociliaire. Or, on constate, au niveau histologique dans le poumon des chevaux poussifs et humains, une métaplasie des cellules en gobelet (Kaup et al., 1990 ; Rogers, 2002) associée à une hypersécrétion des mucines. Cela entraîne des changements tant dans le volume que dans les propriétés biophysiques du mucus, en particulier dans les petites voies respiratoires, phénomène reconnu comme un des éléments clés de la pathophysiologie de la pousse (Gerber et al., 2003). L'exocytose des mucines implique le mouvement des granules de mucine vers la surface interne de la membrane apicale des cellules en gobelet, la fusion des granules avec la membrane, et l'ouverture des granules avec la libération des mucines à la surface des voies respiratoires (Rogers, 2002). MARCKS contrôle le mouvement des granules vers la membrane apicale. Il est à ce titre investigué comme nouvelle cible pharmacothérapeutique dans le traitement de l'hypersécrétion de mucus dans les voies respiratoires chez l'homme (Rogers et Barnes, 2006). Le cheval pourrait non seulement bénéficier de ces recherches mais aussi constituer un modèle expérimental intéressant.

4. RAP2B

RAP2B pourrait jouer, comme chez l'homme, un rôle dans la régulation de la mobilisation rapide et sélective des granules contenant la gélatinase dans les neutrophiles (Mollinedo et al., 1993). Or la mobilisation de ces granules régulerait la fonction neutrophilique et, en particulier, la production du cytochrome b et les processus d'adhésion cellulaire (Mollinedo et al., 1991). Cela en fait une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la pousse vu l'implication de la séquestration des neutrophiles dans cette maladie.

En conclusion, le micro-damier hétérologue humain ne représente pas un outil fiable pour dresser un tableau global de l'expression des gènes lors d'ORVR, que ce soit au site de l'inflammation, c'est-à-dire dans les cellules nucléées du LBA, ou au niveau systémique, à savoir dans les leucocytes sang. L'utilisation du micro-damier comme outil d'investigation de la pathophysiologie de la pousse chez le cheval requiert donc l'élaboration d'un micro-damier homologue équin.

VII. Bibliographie

AINSWORTH D.M., GRUNIG G., MATYCHAK M.B., YOUNG J., WAGNER B., ERB H.N., ANTCZAK D.F. Recurrent airway obstruction (ORVR) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003, 96 , 83–91.

BARUAH P., DUMITRIU I.E., PERI G., RUSSO V., MANTOVANI A., MANFREDI A.A., ROVERE-QUERINI P. The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol.*, 2006, 80, 87-95.

BARNES P.J, ADCOCK I.M. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J.* , 1998, 12, 221–234

BEADLE R.E., HOROHOV D.W., GAUNT S.D. Interleukin-4 and interferon-gamma gene expression in summer pasture-associated obstructive pulmonary disease affected horses. *Equine Vet. J.*, 2002, 34, 389–394.

BOTTAZZI, B., VOURET-CRAVIARI, V., BASTONE, A., DE GIOIA, L., MATTEUCCI, C., PERI, G., SPREAFICO, F., PAUSA, M., D'ETTORRE, C., GIANAZZA, E., TAGLIABUE, A., SALMONA, M., TEDESCO, F., INTRONA, M., MANTOVANI, A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 32817–32823.

BOWLES K. S., BEADLE R. E., MOUCH S., POURCIAU S. S., LITTLEFIELD-CHABAUD M. A., LE BLANC C., MISTRIC L., FERAGLICH D., HOROHOV D. W. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, 87, 385-389.

BREVIARIO F, D'ANIELLO EM, GOLAY J, PERI G, BOTTAZZI B, BAIROCH A, SACCONE S, MARZELLA R, PREDAZZI V, ROCCHI M, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 22190–22197.

BUREAU F, BONIZZI G, KIRSCHVINK N, DELHALLE S, DESMECHT D, MERVILLE MP, BOURS V, LEKEUX P. Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma., *Am J Respir Crit Care Med*, 2000^a, 161, 1314-1321.

BUREAU F, DELHALLE S, BONIZZI G, FIEVEZ L, DOGNE S, KIRSCHVINK N, VANDERPLASSCHEN A, MERVILLE MP, BOURS V, LEKEUX P. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J Immunol*, 2000^b 165, 5822-30.

CASTELLANO, G., WOLTMAN, A. M., NAUTA, A. J., ROOS, A., TROUW, L. A., SEELEN, M. A., SCHENA, F. P., DAHA, M. R., VAN KOOTEN, C. Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro. *Blood* , 2004, 103, 3813–3820.

CHUAQUI R.F., GILLESPIE J.W. FLAIG M.J., HEWITT S.M., PHILLIPS J.L., KRIZMAN D.B., TANGREA M.A., AHAM M., LINEHAN W.M., KNEZEVIC V., EMMERT-BUCK M.R. Post analysis follow up and validation of micro-array experiments. *Nat. Genet.*, 2002, 32: Suppl, 509-514.

CORDEAU M.E., JOUBERT P., DEWACHI O., HAMID Q., LAVOIE J.P. IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary Lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2003, 97, 87–96.

DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E., ARMSTRONG, P.J., STICK, J.A., SLOCOMBE, R.F. Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves). *J. Appl. Physiol.*, 1985, 58, 598-604.

DERKSEN, F.J., OLSZEWSKI, M.A., BUECHNER-MAX-WELL, V.A. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. Vet. J.*, 1995, 152, 283-306.

DIAS A.A., GOODMAN A.R, DOS SANTOS J.L., GOMES R.N., ALTMAYER A., BOZZA P.T., HORTA M.F, VILCEK J., REIS L.F. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J. Leukoc. Biol*, 2001, 69 ,928.

DONI, A., PERI, G., CHIEPPA, M., ALLAVENA, P., PASQUALINI, F., VAGO, L., ROMANI, L., GARLANDA, C., MANTOVANI, A. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* , 2003, 33, 2886–2893.

DUGGAN D. J., BITTNER M., CHEN Y., MELTZER P., TRENT J. M., Expression profiling using cDNA micro-arrays, *Nat. Genet. Suppl.*, 1999, 21, 10-14.

EL AMRAOUI Y., SLIMANI Y. Statistical issues with micro-arrays : processing in anlysis,[en ligne], (2004), Adresse URL:
http://www.info2.uqam.ca/~makareny/BIF7002/Rapport_Youssef_Youness.htm,

consulté le 17/06/2006.

GAO XP, STANDIFORD TJ, RAHMAN A, NEWSTEAD M, HOLLAND SM, DINAUER MC, LIU QH, MALIK AB. Role of NADPH oxidase in the mechanism of lung neutrophil sequestration and microvessel injury induced by Gram-negative sepsis: studies in p47phox^{-/-} and gp91phox^{-/-} mice. *J.Immunol.*, 2002, 168, 3974-3982.

GARLANDA C., EMILIO E., BOZZA S., SALUSTRIK A., DE ACETIS M., NOTAR., MACCAGNOK A, RIVA F., BOTTAZZIB., PERI G., DONI A., VAGO L., BOTTO M., DE SANTISQ R., CARMINATIQ P., SIRACUSAK G., ALTRUDA F., VECCHI A., ROMANI L., MANTOVANI A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 2002, 420, 182-186.

AFFYMETRIX, Genechip essentials [en ligne] (sans date) Adresse URL : http://www.affymetrix.com/corporate/media/genechip_essentials/gene_expression/index.affx, consulté le 05/01/2006

GERBER V, ROBINSON NE, VENTA RJ, RAWSON J, JEFcoat AM, HOTCHKISS JA. Mucin genes in horse airways: MUC5AC, but not MUC2, may play a role in recurrent airway obstruction. *Equine Vet J.*; 2003, 35, 252-257

GERBER V, STRAUB R, MARTI E, HAUPTMAN J, HERHOLZ C, KING M, IMHOF A, TAHON L, ROBINSON NE. Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J.*, 2004, 36, 576-582

GIGA Transcriptomics Facility, Micro-damier FAQ [en ligne] (sans date) Adresse URL : http://www.giga.ulg.ac.be/download/Microarray_Faq.pdf, consulté le 05/01/2006

GIGUERE S., VIEL L., LEE E., MACKAY R.J., HERNANDEZ J., FRANCHINI M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, 85, 147–158.

HANSEL N.N., HILMER S.C., GEORAS S.N., COPE L.M., GUO J., IRIZARRY R.A., DIETTE G.B. Oligonucleotide-microarray analysis of peripheral-blood lymphocytes in severe asthma. *J Lab Clin Med.*, 2005, 145: 263-74.

HIGGINS D., THOMPSON J., GIBSON T. THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22, 4673-4680.

HOROHOV D.W., BEADLE R.E., MOUCH S., POURCIAU S.S. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 2005, 108, 237-245

HORSE GENOME PROJECT [en ligne] (sans date) Adresse URL :

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/>, consulté le 12/02/2006.

KAUP F.J., DROMMER W., DAMSCH S., DEEGEN E. Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J*, 1990, 22(5), 349-355

LAPRISE C, SLADEK R, PONTON A, BERNIER MC, HUDSON TJ, LAVIOLETTE M. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics.*, 2004, 5, 21.

LAVOIE J., MAGHNI K., DESNOYERS M., TAHA R.A., MARTIN J., HAMID Q. Neutrophilic airway inflammation in horses with heaves is characterized by a Th2-type cytokine profile. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2001, 164, 1410–1413.

LEE, G. W., LEE, T. H. & VILCEK, J. TSG-14, a tumour necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J. Immunol.*, 1993, 150, 1804–1812

MOLLINEDO F, PULIDO R, LACAL PM, SANCHEZ-MADRID F. Mobilization of gelatinase-rich granules as a regulatory mechanism of early functional responses in human neutrophils. *Scand J Immunol*, 1991, 34, 33-43.

MOLLINEDO F, PEREZ-SALA D, GAJATE C, JIMENEZ B, RODRIGUEZ P, LACAL JC. Localization of rap1 and rap2 proteins in the gelatinase-containing granules of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1993, 326, 209-214

MUSILOVA P, KUBICKOVA S, VYCHODILOVA-KENKOVA L, KRALIK P, MATIASOVIC J, HUBERTOVA D, RUBES J., HORIN P. Cytogenetic mapping of immunity-related genes in the domestic horse. *Anim Genet*, 2005, 36, 507-510

NADON R., SHOEMAKER J. Statistical issues with micro-arrays: processing and analysis. *Trends in Genetics* ., 2002, 18, 265-271

NAUTA, A. J., BOTTAZZI, B., MANTOVANI, A., SALVATORI, G., KISHORE, U., SCHWAEBLE, W. J., GINGRAS, A. R., TZIMA, S., VIVANCO, F., EGIDO, J., TIJSMA, O., HACK, E. C., DAHA, M. R., ROOS, A. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur. J. Immunol.*, 2003, 33, 465–473.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 1;29.

ROBINSON, N. E. Recurrent Airway Obstruction (Heaves). In: Lekeux P. (Ed.), Equine Respiratory Diseases. International Veterinary Information Service, (www.ivis.org), Ithaca NY 2001.

ROGERS DF. The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2003, 35, 1-6

ROGERS D.F., BARNES P.J. Treatment of airway mucus hypersecretion. *Ann. Med.*, 2006, 38, 116-125.

RUSH B.R., RAUB E.S., RHODES W.S., FLAMINIO M.J., HAKALA J.E., GILLESPIE J.R. Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone. *Am. J. vet. Res.*, 1998, 59, 1039-1043.

SANDERSEN C, BUREAU F, TURLEJ R, FIEVEZ L, DOGNE S, KIRSCHVINK N, LEKEUX P. p65 Homodimer activity in distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol.*, 2001, 80: 315-26.

SANOTS S.E.C., SIQUEIRA F., LUVIZZOTO M.C.R., ANDRADE A.L., EUGENIO F.R., GARCIA J.F. Hybridization of canine breast cancer RNA to human DNA arrays. [en ligne] (05/09/2003), Adresse URL : http://www.ivis.org/proceedings/Keystone/2003/crusco/chapter_frm.asp?LA=1, Consulté le 11/12/2005.

SEAHORN T.L., GROVES M.G., HARRINGTON K.S., BEADLE R.E. Chronic obstructive pulmonary disease in horses in Louisiana. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, 208, 248-251.

SOARES A.C., SOUZA D.G., PINHO V., VIEIRA A.T., NICOLI J.R., CUNHA F.Q., MANTOVANI A., REIS L.F.L., DIAS A.A.M., TEIXEIRA M.M. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes and Infect.*, 2006, 8, 1321-1329.

THOMAS A., CLOSSET R., BUREAU F., LEKEUX P. Principes des microdamiers à ADN et applications potentielles en sciences vétérinaires. *Ann. Med. Vet.*, 2005, 149, 93-116.

TSOI S.C., CALE J.M., BIRD I.M., EWART V., BROWN L.L., DOUGLAS S. Use of human cDNA microarrays for identification of differentially expressed genes in Atlantic salmon liver during *Aeromonas salmonicida* infection. *Mar. Biotechnol.*, 2003, 5, 545-554.

TURLEJ R.K., FIÉVEZ L., SANDERSEN C.F., DOGNÉ S., KIRSCHVINK N., LEKEUX P., BUREAU F. Enhanced survival of lung granulocytes in an animal model of asthma: evidence for a role of GM-CSF activated STAT5 signalling pathway. *Thorax*, 2001, 56, 696-702

VAN ERCK E. Evaluation qualitative et quantitative des dysfonctions respiratoires chez le cheval par la technique des oscillations à impulsions (PhD Thesis). Université de Liège, Belgique, 2003, 227p.

VAN ERCK E., VOTION D., LEKEUX P. Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet. J.*, 2004, 1, 21-28.

VANDENPLAS, M., CORDONNIER-PRATT, M.M., SUZUKI, Y., SUGANO, S., MOORE, J.N., LIANG, C., SUN, F., SULLIVAN, R., SHAH, M., PRATT, L.H. An EST database from equine (*Equus caballus*) stimulated peripheral blood RT leukocytes [en ligne] (5 Juin 2003), Adresse URL: <http://srs.sanger.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-newId+-e+%5Blibs%3D%7BSWALL%20REFSEQ%20EMBL%20REFSEQPROTEIN%7D-all:CD470078%5D+-vn+2> , Consulté le 05/06/2006.

VANDESOMPELE J., DE PRETER K., PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., DE PAEPE A., SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002, 18;3.

VENKATASUBBARAO S. Micro-arrays-status and prospects. *Trends in Biotech.* 2004, 22, 630-637

ZHANG J., ZHENG Z. MILLER W., LIPMAN D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 3389-3402.

ZIMMERMANN N., KING N. E., LAPORTE J., YANG M., MISHRA A., POPE S. M., MUNTEL E. E., WITTE D. P., PEGG A. A., FOSTER P. S., HAMID Q., ROTHENBERG M. E. Dissection of experimental asthma with DNA micro-array analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J. Clin. Invest.*, 2003, 111, 1863-1874.

Tableau I: Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR

Code d'accèsion nucléotide	Nom des gènes	Séquence des amorces 5' -> 3'	Nombre de mer	Température de fusion (°C) 2(A+T)+4(G+C)	Taille du produit PCR (mer)
CD464860	PTX3_F	TGGCCAAAACAAAATAACCAG	22	60	120
	PTX3_R	GTGCTTTCAGATGAATGCTGT	21	60	
CD466615	MARCKS_F	ACATGATAGACAAGATGCTACA	22	60	112
	MARCKS_R	TGTGGTATGTTTTTGATTACAG	22	58	
CD528850	BTG1_F	CTGTACAACCTTTGCCACAATCA	22	62	118
	BTG1_R	CTTTTCCACAAACCACCATCTA	22	62	
BM781169	STAT3_F	GAAATTTTAACATTCTGGGCACA	22	60	114
	STAT3_R	TACCACATCTTTGCTCTCTCAG	22	64	
CD466304	PTPRC_F	ATTATACAGAGAATAATCCACGT	23	60	106
	PTPRC_R	CATCTTTTGTAGCCTTATTTAGTC	23	60	
Alignement H-B-P	CYBB_F	TGACGAGGAGAAAGATGTGATC	22	64	127
	CYBB_R	AGAGGAAAACCTCTATTCTGGT	22	62	
U92481	IL1B_F	TGTCTGTGAATGAGCCCAATCT	22	64	105
	IL1B_R	CTGACATATTTTCAGGCTTGGT	22	62	
AY184956	IL8_F	TCCCTGTTCAACTAAGCCTTG	21	62	110
	IL8_R	AAGTTAATGTGCTTCCACCAGT	22	62	
AB035735	TNF α _F	TGCTCCTCACCCACACCATCA	21	66	104
	TNF α _R	TGCTCTGGGGACTCCGTGTTG	21	68	
CD535759	TUBB_F	CACTAAGAGTGCGCTTGAACAG	22	66	120
	TUBB_R	GGATCCCCAACAACGTGAAGAC	22	68	
CD471597	YWHAZ_F	ACAATCAACAAAACAGTATTTG	22	56	118
	YWHAZ_R	TGTATGTTCTATTGTGCCTAGT	22	60	
BI961633	GAPD_F	TCCTTCTCTTGCTGGGTGATTG	22	66	107
	GAPD_R	GACAATGAATTTGGCTACAGCA	22	62	

F= sens, R= anti-sens.

Tableau II: Etapes, phases, températures et durées des cycles de la RT-PCR

Etapes	Phases	Température (°C)	Temps (s)
1	Activation de l'enzyme	94	600
2	Dénaturation ADN double brins	94	20
3	Hybridation amorces	60	20
4	Synthèse brin d'ADN complémentaire	68	20
5	Retour 35 fois à l'étape 2		
6	Courbe de dénaturation	0,2 de 40 à 94	1

Tableau III: Résultats des tests cliniques, fonctionnels et biochimiques

		CHEVAUX POUSSIFS EN CRISE SEVERE		CHEVAUX POUSSIFS EN CRISE MODEREE		CHEVAUX SAINS	
		MOYENNE	IC 95%	MOYENNE	IC95%	MOYENNE	IC95%
score clinique	score nasal	3,29	0,56	2,80	0,96	1,00	0,00
	score abdominal	3,43	0,39	2,80	0,96	1,00	0,00
	score total	6,71	0,92	5,60	1,92	2,00	0,00
IOS	R5HZ (kPa/L/sec)	0,085	0,025	0,083	0,017	0,083	0,013
	R10HZ(kPa/L/sec)	0,073	0,015	0,079	0,019	0,012	0,020
	X5HZ(kPa/L/sec)	-0,045	0,033	-0,029	0,027	0,002	0,018
	X10HZ(kPa/L/sec)	-0,048	0,027	-0,085	0,097	-0,003	0,020
Endoscopie	Score trachéal	3,0	0,8	ND	ND	1,4	0,8
Comptage	Nombre de cellules (x 10 ⁴ /mL)	24,2	9,1	ND	ND	20,5	3,9
Comptages cellulaires sur lame étalée au cytopspin	Neutrophiles (%)	22,36	11,76	ND	ND	5,90	4,71
	Macrophages (%)	31,76	8,45	ND	ND	38,98	3,32
	Lymphocytes (%)	44,64	11,94	ND	ND	54,04	5,88
	Eosinophiles (%)	0,26	0,33	ND	ND	0,34	0,36
	Mastocytes (%)	0,99	0,86	ND	ND	0,70	0,28
	Nombre total de cellules comptées	267,3	20,3	ND	ND	257,4	26,7
Prise de sang artériel	Température rectale (°C)	37,2	0,2	37,1	0,1	37,6	0,1
	PaO2 (mmHg)	73,1	11,5	83,0	5,8	99,3	6,1
	PaCO2(mmHg)	58,4	9,6	50,4	5,2	45,6	2,8
	SO2 (%)	91,00	6,03	96,00	1,05	97,00	0,74
	Hb (g/dL)	13,3	1,3	13,1	0,7	12,5	1,1
	PH	7,38	0,03	7,41	0,01	7,44	0,02
Prise de sang veineux	Na+ (mmol/L)	141,00	3,17	139,00	2,87	138,00	3,11
	K+(mmol/L)	4,03	0,28	4,05	0,49	3,86	0,13
	Cl-(mmol/L)	100,00	3,50	102,00	4,62	97,30	5,32
	Hématocrite%	37,0	4,1	33,0	3,8	37,0	3,6
	PLT (x10 ⁹ /L)	185,0	45,7	164,0	34,5	174,0	24,6
	WBC (x10 ⁹ /L)	8,65	1,07	7,19	1,62	8,62	1,85
	Granulocytes (x10 ⁹ /L)	4,98	0,92	4,32	0,85	5,20	1,64
	Lymphocytes (x10 ⁹ /L)	2,88	0,75	2,33	0,60	2,45	0,47
Marqueurs de stress Oxydant	Haptoglobine (mg/L)	672	340	788	171	918	277
	Pool (µmol/l)	91,14	22,65	105,80	8,37	106,42	54,86
	Protox (nmol/mg prot)	0,017	0,010	0,011	0,006	0,016	0,006
Divers	prot. Totales (g/L)	70,86	6,62	70,20	3,69	70,00	3,26
	Ac. Urique (mg/L)	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Antioxydants	Vit C (µmol/L)	3,17	0,98	2,42	0,87	2,80	0,61
	CATH (nmol équ.aa/ml)	34,00	9,85	29,60	10,67	33,67	12,71
	CATL (nmol équ.aa/ml)	9,17	1,24	8,92	3,53	10,57	1,64

Tableau IV: Gènes sur-exprimés dans les cellules nucléées du LBA des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains

Gene	Sonde Affymetrix®	Log2	Titre du gène
TRIB1	202241_at	2	tribbles homolog 1 (Drosophila)
GADD45A	203725_at	2,6	"growth arrest and DNA-damage-inducible 'alpha"
PTX3	206157_at	3,6	"pentraxin-related gene rapidly induced by IL-1 β "

Tableau V: Gènes sous-exprimés dans les cellules nucléées du LBA des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains

Gene	Sonde Affymetrix®	Log2	Titre du gène
MARCKS	201668_x_at	-3,9	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
EIF5A	201123_s_at	-3,3	eukaryotic translation initiation factor 5A
CUGBP2	202157_s_at	-3,1	"CUG triplet repeat'RNA binding protein 2"
STAT3	208992_s_at	-3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
MNAB	220202_s_at	-2,6	membrane associated DNA binding protein
SAR1A	210790_s_at	-2,3	SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae)
RAP2B	214487_s_at	-2,2	member of RAS oncogene family ///
IQGAP1	213446_s_at	-2,2	IQ motif containing GTPase activating protein 1
RAB6A	201048_x_at	-2	"RAB6A 'member RAS oncogene family"
ZNF148	203318_s_at	-2	zinc finger protein 148 (pHZ-52)

Tableau VI: Gènes sous-exprimés dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux sains

Gene	Sonde Affymetrix®	Log2	Titre du gène
SF3B1	201070_x_at	-3,6	"splicing factor 3b 'subunit 1
C14orf92	201683_x_at	-2,9	chromosome 14 open reading frame 92
MBNL1	201151_s_at	-2,9	muscleblind-like (Drosophila)
SF3B1	214305_s_at	-2,9	"splicing factor 3b 'subunit 1
STAT3	208992_s_at	-2,7	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
FOXO3A	204132_s_at	-2,6	forkhead box O3A
WAC	219679_s_at	-2,6	WW domain containing adaptor with coiled-coil
CUGBP2	202157_s_at	-2,6	"CUG triplet repeat 'RNA binding protein 2"
PTPRC	212587_s_at	-2,5	"protein tyrosine phosphatase 'receptor type
USP33	214843_s_at	-2,5	ubiquitin specific peptidase 33
CSPG6	209258_s_at	-2,4	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)
NARG1	219158_s_at	-2,4	NMDA receptor regulated 1
HSPD1	200806_s_at	-2,4	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
PICALM	215236_s_at	-2,4	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
ADD3	205882_x_at	-2,3	adducin 3 (gamma)
ZNF148	203319_s_at	-2,3	zinc finger protein 148 (pHZ-52)
CYBB	203922_s_at	-2,3	"cytochrome b-245 'beta polypeptide (chronic granulomatous disease)"
SFRS1	201742_x_at	-2,3	"splicing factor 'arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2
HRB	213926_s_at	-2,3	HIV-1 Rev binding protein
ATP2B1	209281_s_at	-2,3	"ATPase 'Ca ⁺⁺ transporting
CPD	201942_s_at	-2,2	carboxypeptidase D
FXR1	201635_s_at	-2,2	"fragile X mental retardation 'autosomal homolog 1"
DDX3X	201211_s_at	-2,2	"DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3 'X-linked"
TAOK3	220761_s_at	-2,1	TAO kinase 3
ZNF148	203318_s_at	-2,1	zinc finger protein 148 (pHZ-52)
UBE2W	218521_s_at	-2,1	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)
ARFGEF1	216266_s_at	-2,1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor1 (brefeldin A-inhibited)
HSPCA	211969_at	-2,1	"heat shock 90kDa protein 1 'alpha"
RAP2B	214487_s_at	-2	"RAP2A 'member of RAS oncogene family ///
LOC285412	217448_s_at	-2	chromosome 14 open reading frame 92 /// Epidermal Langerhans cell protein LCP1 C14orf92 ///
TCF4	212382_at	-2	Transcription factor 4

Tableau VII: Gènes sous-exprimés dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse sévère par rapport aux chevaux en crise de pousse modérée

Gene	Sonde Affymetrix®	Log2	Titre du gène
SF3B1	201070_x_at	-2,8	"splicing factor 3b 'subunit 1
USP33	214843_s_at	-2,6	ubiquitin specific peptidase 33
PICALM	215236_s_at	-2,6	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
C14orf92	201683_x_at	-2,5	chromosome 14 open reading frame 92
SF3B1	214305_s_at	-2,3	"splicing factor 3b 'subunit 1
STAT3	208992_s_at	-2,2	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
ADD3	205882_x_at	-2,1	adducin 3 (gamma)
BTG1	200920_s_at	-2	"B-cell translocation gene 1 'anti-proliferative"
MBNL1	201151_s_at	-2	muscleblind-like (Drosophila)
FXR1	201635_s_at	-2	"fragile X mental retardation 'autosomal homolog 1"
FOXO3A	204132_s_at	-2	forkhead box O3A

Tableau VIII: Gènes sous-exprimés dans les leucocytes sanguins des chevaux en crise de pousse modérée par rapport aux chevaux sains

HNRPH1	213472_at	-3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)
RBBP6	205178_s_at	-2,1	retinoblastoma binding protein 6
STK4	211085_s_at	-2	serine/threonine kinase 4 /// serine/threonine kinase 4

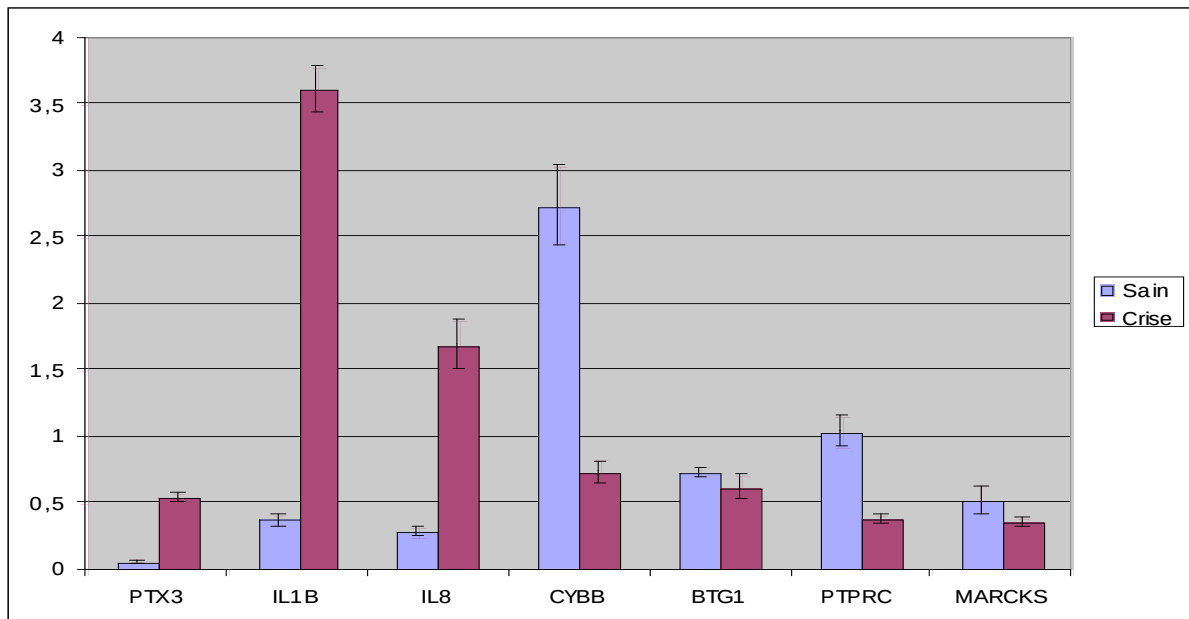


Figure 1: Résultats de la RT-PCR réalisée sur les cellules nucléées du lavage broncho-alvéolaire des chevaux sains et en crise sévère, exprimés en rapport de Ct par rapport au gène invariant GAPDH.

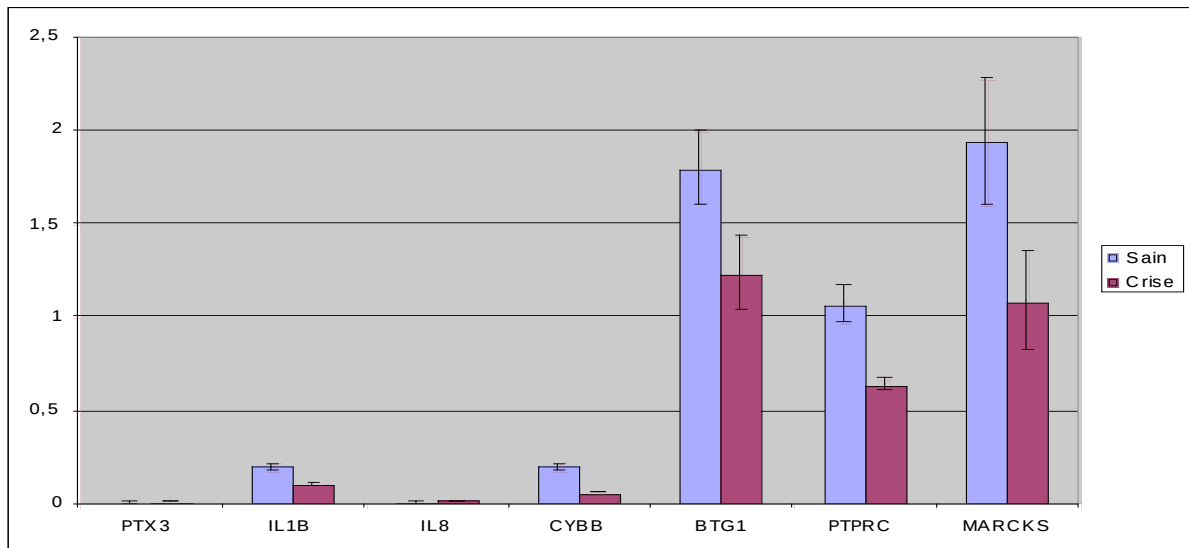


Figure 2: Résultats de la RT-PCR réalisée sur les leucocytes du sang des chevaux sains et en crise sévère, exprimés en rapport de Ct par rapport au gène invariant GAPDH.